



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAROLINE NATÂNIA DE SOUZA ARAUJO

DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CULTIVO CELULAR
TRIDIMENSIONAL PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS E
CARCINOMA SEROSO DE BAIXO GRAU DE OVÁRIO

*THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE MODEL FOR STUDING OF
INTERACTION BETWEEN LYMPHOCYTES AND LOW-GRADE OVARIAN SEROUS
CARCINOMA*

CAMPINAS

2020

CAROLINE NATÂNIA DE SOUZA ARAUJO

DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CULTIVO CELULAR
TRIDIMENSIONAL PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS E
CARCINOMA SEROSO DE BAIXO GRAU DE OVÁRIO

*THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE MODEL FOR STUDING OF
INTERACTION BETWEEN LYMPHOCYTES AND LOW-GRADE OVARIAN SEROUS
CARCINOMA*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de mestra em Ciências, na área de Clínica
Médica.

*Master's Dissertation presented to the School Medical Sciences
of University of Campinas as part of the requirements to obtain the title
MSc grade in Sciences, in the area of Medical Clinic.*

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO GUIMARÃES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA CAROLINE NATÂNIA DE SOUZA ARAUJO,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO GUIMARÃES.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89d Souza-Araújo, Caroline Natânia, 1991-
Desenvolvimento de modelo de cultivo celular tridimensional para estudo da interação entre linfócitos e carcinoma seroso de baixo grau de ovário / Caroline Natânia de Souza Araújo. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Fernando Guimarães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Linhagem celular CAISMOV24. 2. Esferoides celulares. 3. Magnetismo. 4. Linfócitos T reguladores. 5. Linfócitos infiltrantes no tumor. I. Guimarães, Fernando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Three-dimensional cell culture model for studying of interaction between lymphocytes and low-grade ovarian serous carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Cell line CAISMOV24

Spheroids, Cellular

Magnetism

T-regulatory lymphocytes

Tumor-infiltrating lymphocytes

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Fernando Guimarães [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Giovanna Rosa Degasperi

Data de defesa: 18-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9264-6508>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3801671989741011>

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE
MESTRADO**

CAROLINE NATÂNIA DE SOUZA ARAUJO

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO GUIMARÃES

MEMBROS:

1. PROF. DR. FERNANDO GUIMARÃES

2. PROFA. DRA. CRISTINA PONTES VICENTE

3. PROFA. DRA. GIOVANNA ROSA DEGASPERI

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 18/02/2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Lilian por cultivar desde a infância meu desejo de aprender e por me ensinar com seu o exemplo a não desistir quando as coisas não acontecem como esperado.

Ao meu marido Miguel por todo o esforço despendido para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Fernando por ser mais que um orientador, sempre disposto a me ajudar em momentos cruciais não só na pesquisa como na vida.

Agradeço ao Paulo por sua prontidão, pois além de me apresentar ao Fernando, o que permitiu o ingresso no mestrado, sempre esteve disposto a ajudar de modo altruísta.

À Taís por despertar meu amor pela pesquisa, por dedicar seu tempo para me ensinar e por ser um excelente exemplo para seguir como profissional.

À Marcela e a Cecília por trazerem aos dias de ensaios no laboratório alegria e cumplicidade.

À Cláudia por sua dedicação em me ajudar a completar o trabalho mesmo me conhecendo há tão pouco tempo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/06959-1 por possibilitar a execução deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior-Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001.

*Hoje desaprendo o que tinha aprendido até
ontem e que amanhã recomencarei a aprender*

Cecília Meireles

RESUMO

Introdução: Existe um número limitado de linhagens celulares estabelecidas de câncer de ovário que correspondam ao histotipo seroso de baixo-grau disponível para fins de pesquisa. Em geral, estas linhagens celulares, assim como outras de origem epitelial, são mantidas em frascos de cultivo que permitem a adesão e crescimento bidimensional (2D) das células, resultando em uma monocamada. Contudo, o cultivo tridimensional (3D) permite a formação de agregados celulares com características de tecidos, preservando interação e função celulares. Portanto, estratégias de cultivo celular 3D resultam em modelos *in vitro* mais adequados para estudos das interações entre células e o próprio microambiente.

Objetivo: O objetivo neste estudo foi o de caracterizar o desenvolvimento de uma linhagem celular de carcinoma seroso ovariano de baixo-grau em um sistema de cultivo celular 3D baseado no uso de campo magnético para promover a agregação das células. Além disso, avaliar este sistema de cultivo para gerar agregados de células neoplásicas contendo linfócitos.

Sujeitos e Métodos: Células da linhagem CAISMOV24 isoladas ou misturadas com células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) foram cultivadas empregando-se um sistema de cultivo 3D disponível comercialmente (Bio-AssemblerTM). Assim, células CAISMOV24 conjugadas a nanopartículas magnéticas foram lançadas isoladamente ou cocultivadas (proporção 5:1) com CMSP conjugadas ou não a nanopartículas magnéticas, utilizando-se placas de baixa adesão contendo 24 poços (10^5 a $1,2 \times 10^5$ células/400ul de meio RPMI-1640 suplementado/ poço). As placas foram incubadas (37°C/ 5%CO₂) pelo período de 3h sobre o magneto de *bioprint* e, a seguir, mantidas por todo o período de cultivo (até 72h) sob o magneto de levitação. Adicionalmente, utilizou-se a suplementação do meio de cultura com a IL-15 como uma variação do cocultivo 3D. Os agregados celulares obtidos foram avaliados quando a morfologia, histologia, marcadores moleculares, bem como, presença e subtipos de linfócitos, por meio de cortes histológicos, imuno-histoquímica e citometria de fluxo. VPD450 foi empregado para se determinar a taxa de proliferação das células CAISMOV24 nas culturas 3D.

Resultados: Os agregados celulares resultantes revelaram a capacidade intrínseca das células CAISMOV24 de formarem estruturas papilares. Foi detectada expressão nuclear das moléculas PAX8 e receptora de progesterona, moléculas frequentemente encontradas superexpressadas nos carcinomas ovarianos, o que indicou a preservação da função celular no cultivo 3D. O índice médio de proliferação das células CAISMOV24 na cultura 3D ($1,89 \pm 0,15$ vezes) foi significativamente menor ($p < 0,0001$) em comparação com a cultura 2D ($3,14 \pm 0,09$ vezes). O conteúdo de linfócitos nos agregados

celulares cocultivados foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando se empregou CMSP conjugadas com nanopartículas ($15,0 \pm 3,80\%$) em comparação às coculturas com CMSP não conjugadas ($9,20 \pm 0,84\%$). Além disso, os subconjuntos de linfócitos NK, TCD4, TCD8 e T-reguladores (T-reg) foram recuperados com sucesso dos agregados celulares decorridas 72h de cocultivo celular. Foi observado aumento significativo na expressão da molécula CD69 nos linfócitos NK e TCD8, indicando ativação funcional destes linfócitos. O aumento de CD69 nos linfócitos TCD8 foi associado à suplementação do meio de cultura com IL-15, enquanto que nos linfócitos NK foi associado à presença das células CAISMOV24. **Conclusão:** O sistema de cultivo celular 3D empregado permitiu que a linhagem celular CAISMOV24 restaurasse a morfologia papilar característica do tumor original, bem como, permitiu gerar agregados celulares contendo linfócitos, assumindo-se ser adequado para o estudo das interações entre células do sistema imunológico e neoplásicas.

Palavras-chave: Linhagem celular CAISMOV24. Esferoide. Magnetismo. Linfócitos T-reguladores. Linfócitos infiltrantes tumorais.

ABSTRACT

Introduction: There is a limited number of established ovarian cancer cell lines matching the low-grade serous histotype available for researching purposes. In general, these cell lines, as well as others of epithelial origin, are kept in culture flasks that allow adhesion and two-dimensional (2D) growth of cells, resulting in a monolayer. However, three-dimensional (3D) culture allows the formation of cellular aggregates with tissue characteristics, preserving cellular interaction and function. Therefore, 3D cell culture strategies result in *in vitro* models more suitable for studies of interactions between cells and the microenvironment itself. **Objective:** The goal in the study was to characterize the growth of a given low-grade serous ovarian carcinoma cell line in a 3D culture system conducted on a magnetic field. Moreover, the culture system was evaluated in respect to the assembly of malignant cell aggregates containing lymphocytes. **Subjects and Methods:** CAISMOV24 cell line alone or mixed with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured using a commercially available 3D culture system designed for 24 well plates. Briefly, CAISMOV24 cells conjugated to magnetic nanoparticles were incubate alone (10^5 /well) or co-cultured with PBMC conjugated or not to magnetic nanoparticles (5: 1 ratio, 1.2×10^5 /well). The plates were incubated (37°C / 5% CO_2) for a period of 3 hours on the bioprint magnet and then maintained for the entire culture period (up to 72 hours) under the levitation magnet. Additionally, supplementation of the culture medium with IL-15 was used as a variation of the 3D co-culture. The cell aggregates obtained were evaluated when the morphology, histology, molecular markers, as well as, presence and subtypes of lymphocytes, through histological sections, immunohistochemistry and flow cytometry. VPD450 was used to determine the proliferation rate of CAISMOV24 cells in 2D and 3D cultures. **Results:** Resulting cell aggregates revealed the intrinsic capacity of CAISMOV24 cells to assemble structures morphologically defined as papillary. In addition, nuclear expression of PAX8 and progesterone receptor molecules was detected, molecules frequently found over expressed in ovarian carcinomas. The average proliferation index of CAISMOV24 cells in the 3D culture (1.89 ± 0.15 times) was significantly lower ($p < 0.0001$) compared to the 2D culture (3.14 ± 0.09 times). The contents of lymphocytes into co-cultured cell aggregates were significantly higher ($p < 0.05$) when NanoShuttle-conjugated PBMC were employed compared with non-conjugated PBMC. Moreover, lymphocyte subsets NK, T-CD4, T-CD8 and T-regulatory were successfully retrieved from co-cultured cell aggregates at 72h. Thus, the culture system allowed CAISMOV24 cell line to develop papillary-like cell aggregates containing lymphocytes. A significant increase in expression of the CD69 molecule was observed in NK

and TCD8 lymphocytes, indicating functional activation of these lymphocytes. **Conclusion:** The culture system allowed CAISMOV24 cell line to develop papillary-like cell aggregates containing lymphocytes. Therefore, we consider that this 3D culture system is suitable for the study of immune cellular interactions in the tumor microenvironment.

Keywords: Cell line CAISMOV24. Spheroid. Magnetism. T-regulatory lymphocytes. Tumor infiltrating lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem contendo os equipamentos presentes no Kit Bioassembler® para placa de 24 poços.....	22
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D: tridimensional

2D: bidimensional

CAISMOV24: Linhagem celular de carcinoma seroso de baixo grau de ovário

CMSPs: Células mononucleares do sangue periférico

CD: *Cluster of differentiation* (Marcador de diferenciação)

CEO: Carcinoma epitelial de ovário

CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (Corante de proliferação celular éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína)

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole* (Corante fluorescente para DNA 4',6-diamidino-2-fenilindol)

H&E: Hematoxilina e eosina

ILs: Interleucinas

MFI: *Medium fluorescence index* (Índice médio de fluorescência)

NK: *Natural Killer* (Células NK)

PBS: Tampão fosfato-salina

RPMI: Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640

SFB: Soro fetal bovino

T-reg: Linfócitos T reguladores

ULA: *Utra-low adesion* (Placa de baixa adesão)

VPD450: *Violet Proliferation Dye 450* (Corante de proliferação celular 450)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. METODOLOGIA	19
3.1. Desenho do estudo	19
3.2. Tamanho amostral	19
3.3. Seleção dos sujeitos	19
3.4. Coleta de dados	19
3.5. Procedimentos e ensaios	20
3.5.1. Cultivo 2D e 3D da linhagem CAISMOV24	20
3.5.2. Amostras de sangue	22
3.5.3. Cocultivo tridimensional de CAISMOV24 e linfócitos	22
3.5.4. Análise histológica e imuno-histoquímica	23
3.5.5. Fenotipificação de linfócitos	24
3.5.6. Cinética de crescimento em cultura 2D e 3D da CAISMOV24	25
3.6. Variáveis e Conceitos	26
3.7. Processamento e análise dos dados	27
3.8. Controle de qualidade	27
3.9. Aspectos éticos	28
4. RESULTADOS	29
5. DISCUSSÃO GERAL	40
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS	43
8. APÊNDICE	49
9. ANEXOS	52
ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	52
ANEXO II- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	61

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epitelial de ovário (CEO) é o mais letal entre os cânceres ginecológicos, ocupando o quinto lugar entre as causas de morte de mulheres por câncer. A cirurgia é curativa quando a enfermidade está limitada ao ovário. Entretanto, 79% das mulheres são diagnosticados com CEO em estágios avançados, para as quais a sobrevida em 5 anos é de 20-25% (1-3). A razão para o diagnóstico tardio do câncer de ovário está em sua natureza assintomática e na ausência de marcadores para triagem precoce da doença. Dor e inchaço abdominal podem ser os primeiros sintomas, os quais estão frequentemente associados com metástases e a formação de ascite (4).

Noventa por cento dos cânceres de ovário são de origem epitelial. Compreendem quatro tipos histológicos, os quais são categorizados entre tumores de baixo-grau (ou tipo I) e tumores de alto-grau (ou tipo II) com base em características moleculares e de crescimento. O tipo histológico seroso compreende 70% dos cânceres epiteliais de ovário, entre os quais, os de alto-grau, respondem por dois terços de todas as mortes por câncer de ovário (2, 5, 6). Embora o tumor seroso de baixo-grau seja menos frequente que o de alto-grau, mulheres com carcinoma seroso de baixo-grau avançado ou recorrente apresentam taxa de sobrevida semelhante à de mulheres com tumores de alto-grau (7,8).

O tratamento de tumores em grau avançado baseia-se na cirurgia e quimioterapia com agentes derivados de platina (carboplatina e cisplatina) em combinação com taxanos (paclitaxel e docetaxel) (9). Contudo, a maioria das pacientes (60-70%) que recidivam entre 2 e 5 anos após a primeira linha de tratamento evoluem para óbito (2, 10). A natureza difusa do câncer de ovário e a rápida disseminação metastática limitam a eficácia do tratamento, bem como, respondem pela característica dos carcinomas ovarianos avançados desenvolverem ascite peritoneal (10-13).

Linhagens celulares são obtidas por meio do cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido ou fluido contendo células. Em condições ideais de cultivo, estas células se proliferam sendo necessário à expansão. Após o primeiro repique, a cultura primária se torna o que é conhecido como linhagem celular. A capacidade de proliferação de uma linhagem é, em geral, limitada podendo durar algumas semanas antes de perder sua capacidade proliferativa. Essas linhagens celulares são conhecidas como finitas, entretanto, algumas linhagens celulares se tornam imortais, por meio de um processo chamado de transformação, o qual pode ocorrer de modo espontâneo ou induzido (14).

Linhagens celulares provenientes de diferentes neoplasias têm sido amplamente estabelecidas e empregadas na pesquisa científica, incluindo os carcinomas ovarianos. Usualmente, o cultivo e manutenção das linhagens celulares são mais simples e padronizados que o de células neoplásicas primárias e agrega vantagens como a possibilidade de serem armazenadas e compartilhadas entre diferentes laboratórios de pesquisa, ampliando seu uso como modelos experimentais *in vitro* (15,16). Entretanto, as linhagens celulares são suscetíveis à seleção clonal, alterações genéticas e/ou metabólicas decorrentes dos longos períodos de manutenção *in vitro*, o que pode alterar características celulares relevantes e distanciar as linhagens celulares de suas células cognatas. Preferencialmente, quanto mais semelhanças existir entre a linhagem celular e as células neoplásicas primárias, maior será a utilidade da linhagem como modelo experimental. A “Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia” inclui 52 linhagens celulares de câncer de ovário humano (16). Jacob e colaboradores publicaram uma revisão incluindo 104 linhagens celulares humanas derivadas de neoplasias de ovário ou de células da superfície epitelial do ovário (15). Entretanto, muitas dessas linhagens não são bem caracterizadas e algumas das linhagens celulares frequentemente utilizadas como modelos experimentais não correspondem de fato aos respectivos tipos histológicos, conforme demonstrado por Domcke e colaboradores que compararam o perfil genômico de 47 linhagens celulares ovarianas com amostras de tumores de ovário (17).

Assim, novas linhagens celulares bem caracterizadas, bem como, desenvolvimento de sistemas de cultivo celular que preservem a natureza histológica e molecular dos diferentes subtipos de neoplasias ovarianas são necessárias como modelos experimentais para o estudo acurado desta doença. Particularmente, o histotipo seroso de baixo-grau do carcinoma epitelial de ovário é conhecido por ser de difícil cultivo e apresentar poucas linhagens celulares estabelecidas (MPSC-1, HOC-7, OAW42 e PEO16) disponíveis para estudo (18,19).

CAISMOV24 é uma nova linhagem de CEO humano, estabelecida recentemente por Guimarães e colaboradores do Hospital da Mulher-CAISM da Unicamp (20). A linhagem celular CAISMOV24 foi estabelecida pela imortalização espontânea durante o cultivo *in vitro* de células neoplásicas primárias que foram obtidas a partir de uma ascite carcinomatosa associada ao carcinoma seroso ovariano de baixo-grau de uma mulher com 60 anos de idade. Esta linhagem celular vem sendo mantida por mais de 115 passagens *in vitro*. O emprego da técnica de hibridização genômica comparativa, mostrou que o padrão de alterações genômicas da CAISMOV24 se mantém semelhante ao das células neoplásicas primárias que a originou, favorecendo o potencial uso das células CAISMOV24 como modelo experimental *in vitro* para o estudo do carcinoma seroso de baixo-grau de ovário (21).

A maioria dos estudos do CEO humano utilizando modelos *in vitro* baseia-se em sistemas de cultivo bidimensional (2D). Nestes sistemas, as células de origem epitelial crescem aderidas à superfície plástica do frasco de cultivo, formando uma monocamada celular. Embora este sistema de cultivo tenha possibilitado a aquisição de conhecimentos sobre a biologia tumoral sua utilidade é limitada, pois não reproduz a complexidade do microambiente tumoral, o que resulta em alterações morfológicas e funcionais das células. Por outro lado, no sistema de cultivo tridimensional (3D) busca-se recriar características fundamentais dos tecidos, reproduzindo a arquitetura e preservando a função das células que o constituem. Este sistema de cultivo deve possibilitar a interação entre vários tipos de células, produção de matriz extracelular para sustentação e regulação da função celular e síntese de fluídos intersticiais. Assim, modelos para estudo baseados neste sistema oferecem maior acurácia fisiológica, situando-os entre os modelos bidimensionais *in vitro* e os modelos *in vivo* (22-25).

Um exemplo clássico que mostra as vantagens do sistema 3D sobre o 2D provém dos estudos coordenados por Bissell na década de 80 (26). Naquela ocasião, observou-se que células epiteliais mamárias de camundongo cultivadas sobre matriz extracelular, recriavam o arranjo morfológico encontrado *in vivo* e preservavam a função produtora de proteínas lácteas. Em comparação, na ausência da matriz extracelular as células cresciam como monocamada e não eram capazes de produzir proteínas lácteas, mesmo quando estimuladas por hormônios lactogênicos. Tais diferenças funcionais entre os dois sistemas de cultivo celular refletem alterações da expressão gênica. Neste sentido, Lawrenson e colaboradores em 2013 (27) mostraram que a expressão gênica de células epiteliais das trompas de falópio cultivadas no sistema 3D assemelhou-se a das células *in vivo*, enquanto o cultivo 2D promoveu alterações da expressão.

Frequentemente, os modelos de cultivo 3D de neoplasias, incluindo os de CEO, são obtidos pelo cultivo de fragmentos de tecido, suspensões de células primárias ou de linhagens celulares sobre uma matriz polimérica natural ou sintética (28). Tais modelos vêm sendo empregados para estudos focados na interação entre as células neoplásicas com a matriz extracelular, mecanismos da invasão maligna, suscetibilidade e resistência das células neoplásicas a drogas (28-30) e, mais recentemente, na interação do sistema imunológico com o microambiente tumoral (31,32).

Outro recurso utilizado para gerar estruturas neoplásicas tridimensionais *in vitro*, baseia-se no emprego de recipientes que impedem a adesão das células, os quais combinados ao uso de meios de cultivo adequados e/ou agitação, promovem o crescimento de células

epiteliais como agregados celulares ou esferóides (33-35). Recentemente, uma nova tecnologia de cultivo 3D foi disponibilizada comercialmente, a qual se baseia no emprego de campo magnético para promover a levitação de células conjugadas a nanopartículas que contém ferro (21). Este sistema foi empregado com sucesso para gerar esferóides de diversos tipos celulares, incluindo células-tronco, células primárias e linhagens neoplásicas humanas e de outras espécies (21). A geração de esferóides em cultura celular é particularmente interessante como modelo *in vitro* para estudo do carcinoma epitelial seroso de ovário, visto que os agregados celulares formados são semelhantes àqueles encontrados nas ascites carcinomatosas e estão associados com a disseminação metastática nesta neoplasia.

É consenso que as diferentes populações de linfócitos encontradas infiltrando ou associadas aos tumores, bem como as interleucinas (IL) produzidas por estas células, têm significado clínico e valor prognóstico inclusive no câncer de ovário (36). Especificamente, observou-se que pacientes com câncer de ovário tratadas por cirurgia e quimioterapia, cujos tumores continham infiltrado de linfócitos, identificados pela expressão da molécula de diferenciação CD3 (*cluster of differentiation 3*) em sua superfície apresentaram sobrevida superior àquelas sem o mesmo infiltrado linfocitário (37,38). Subsequentemente, observou-se que presença de infiltração de linfócitos T do subtipo CD8 corresponderia a um marcador de sobrevida melhor que o CD3 (36,39). Em contraste, a infiltração de linfócitos T reguladores (T-reg) foi associada à menor sobrevida e ao comprometimento da função imunológica (40-42). Além disso, a presença de linfócitos T-reg bem como linfócitos T de memória e células natural killer (NK) tem sido documentada nas ascites carcinomatosas associadas ao câncer de ovário (43,44).

Todos os aspectos biológicos dos linfócitos são modulados por ILs. Entre outras, a IL-2 e a IL-15 possuem propriedades parcialmente sobrepostas e estão implicadas no desenvolvimento, sobrevida e citotoxicidade dos linfócitos efetores, bem como produção de imunoglobulina por linfócitos B (44). Embora ambas ILs sejam primordialmente estimuladoras da resposta linfocitária, a ação prolongada da IL-2 pode gerar um efeito inibidor por meio da ativação dos linfócitos T-reg, enquanto que a IL-15 não tem o mesmo efeito (44-46).

Assim, o objetivo neste estudo foi caracterizar o desenvolvimento de uma linhagem celular de carcinoma ovariano seroso de baixo grau utilizando um sistema de cultura 3D disponível comercialmente, o qual se baseia no uso de campo magnético para induzir a agregação celular. Além disso, avaliar este sistema de cultura 3D para promover agregados de células neoplásicas contendo linfócitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar um sistema de cultivo 3D baseado em campo magnético para gerar agregados com células de carcinoma ovariano seroso de baixo-grau contendo linfócitos.

2.2. Objetivos Específicos

Caracterizar o desenvolvimento da linhagem celular CAISMOV24 no sistema de cultivo n3D Biosciences quanto a histologia, proliferação celular e marcadores moleculares.

Avaliar o sistema de cultivo n3D Biosciences para promover agregados de células neoplásicas contendo linfócitos.

Fenotipificar os linfócitos presentes nos agregados de células CAISMOV24.

3. METODOLOGIA

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional descritivo sobre o desenvolvimento da linhagem celular CAISMOV24 quando submetida ao sistema de cultivo 3D, baseado na levitação e concentração celular por magnetismo, e ainda, em associação com linfócitos.

3.2. Tamanho amostral

Por se tratar de um estudo descritivo do comportamento de uma linhagem celular quando submetida a condições específicas de cultivo *in vitro* e cujos resultados não seriam extrapolados para explicar o comportamento de populações, não se aplicou o cálculo de tamanho amostral. Todavia, foram realizadas repetições experimentais do cocultivo da linhagem CAISMOV24 com CMSPs para determinação das variâncias dos resultados de parâmetros quantitativos.

3.3. Seleção dos sujeitos

Foram incluídos neste estudo sete participantes, convidados entre os membros do grupo de pesquisa que cederam uma amostra de 18mL de sangue periférico colhido por punção da veia do braço. Como o método foi avaliado quanto ao seu potencial de uso para estudar interações entre CEO e linfócitos e não pelas interações em si, foi optado pelo uso de CMSPs de participantes saudáveis, além disso, o uso de linfócitos de pacientes poderia trazer respostas de memória às células carcinomatosas, podendo gerar dúvidas sobre os resultados. Os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido feita após receberem esclarecimento quanto aos objetivos da pesquisa e procedimentos a serem submetidos, observando-se como critérios de inclusão, serem sujeitos adultos e saudáveis. Os procedimentos adotados neste projeto foram homologados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e respeitaram os princípios enunciados na Declaração de Helsinque e na resolução CNS 466/2012 do Ministério da Saúde. Finalmente, adotou-se como critérios de exclusão qualquer fato ou incidente que inviabilizasse as amostras.

3.4. Coleta de dados

Todos os experimentos envolvendo o cultivo celular da linhagem CAISMOV24 nos sistemas 2D e 3D, bem como, o cocultivo de CAISMOV24 com CMSPs foram realizados em

sala apropriada para o cultivo celular com nível de biossegurança 2, localizada nos Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM.

Oito agregados das células CAISMOV24 obtidos pelo cultivo 3D foram processados para obtenção de cortes de tecido embebido em parafina, corados com hematoxilina e eosina (H&E), destinados à caracterização histológica dos agregados. Seis agregados celulares foram processados para obtenção de cortes histológicos por congelação, destinados aos ensaios de imunohistoquímica para determinação da expressão dos biomarcadores PAX8, receptor de progesterona e receptor de estrógeno. A comparação da proliferação celular entre os dois sistemas de cultivo, baseou-se em ensaios utilizando a citometria de fluxo e células CAISMOV24 marcadas com o corante de proliferação violeta 450 (VPD450), os quais foram realizado em triplicata para células cultivadas no sistema 2D, enquanto para o sistema 3D foram realizadas sete repetições experimentais agrupando-se quatro agregados celulares por repetição experimental.

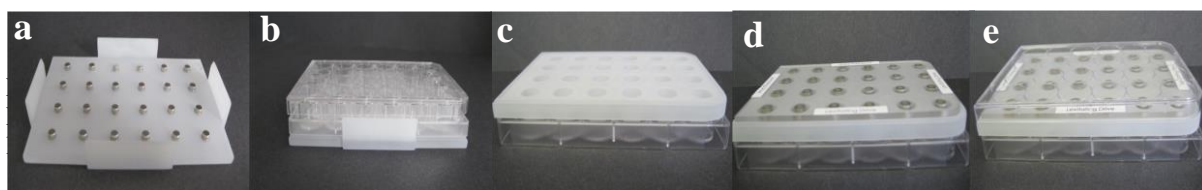
A coleta de sangue periférico de doadores saudáveis, destinada ao isolamento de CMSPs para o cocultivo 3D com células CAISMOV24 foi realizada pela equipe de enfermagem do CAISM. O isolamento das CMSP foi realizado em sala apropriada para o cultivo celular com nível de biossegurança 2, localizada nos Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM. Foram realizadas sete repetições experimentais (7 doadores) agrupando-se quatro a seis agregados celulares para determinação do conteúdo de linfócitos e fenotipificação por meio da citometria de fluxo.

Gráficos biparamétricos foram plotados para a determinação das populações de linfócitos. Essa determinação se baseou na presença e/ou ausência das moléculas de superfície CD56, CD3, CD8, CD4, CD25, CD127 mostrada em forma de porcentagem. A ativação celular dos linfócitos citotóxicos (NK e TCD8⁺) foi determinada pelo índice médio de fluorescência (MFI, *medium fluorescence index*) da molécula CD69, que é um receptor primário de ativação expresso na superfície celular. Dois agregados celulares originários do cocultivo das células CAISMOV24 com CMSPs marcadas com corante fluorescente éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) foram processados para obtenção de cortes histológicos por congelação, destinados para a visualização dos linfócitos em microscopia de fluorescência.

3.5. Procedimentos e ensaios

3.5.1. Cultivo 2D e 3D da linhagem CAISMOV24

A linhagem de células de câncer de ovário CAISMOV24 foi mantida em RPMI-1640 (Nutricell, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, Campinas, Brasil) e 2mM de L-glutamina (Nutricell, Campinas, Brasil). Culturas 2D foram realizadas semeando 10^4 células/cm² em frascos de cultura (JetBiofil, Guangzhou, China). As culturas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, submetidas a troca do meio de cultura a cada dois dias e tratadas com tripsina/EDTA (Nutricell, Campinas, Brasil) para a replicação celular a cada duas semanas. Foram utilizadas células da linhagem CAISMOV24 entre as passagens 84 a 88 neste estudo. O cultivo 3D foi realizado usando o kit Bio-Assembler™ projetado para placas de 24 poços (n3D-Biosciences Inc, Houston, EUA). Em resumo, foi adicionado na cultura 2D de CAISMOV24 o NanoShuttle™, na proporção de 1µl de NanoShuttle™ para cada 20.000 células. A cultura foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. Em seguida, as células foram desprendidas do frasco de cultivo por meio de incubação com 5mL de tripsina por 5 minutos, a tripsina foi retirada por meio de duas lavagens (centrifugação 600g/5min) com PBS (Tampão fosfato-salina, Nutricell, Campinas, Brasil). As células foram resuspensas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina. A viabilidade celular foi determinada por coloração azul de tripan (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha, 1% p/v em PBS) e a densidade foi ajustada para 10^6 células/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina. Células CAISMOV24 conjugadas com NanoShuttles™ foram semeadas 10^5 /poço em placa de baixa adesão celular (*ultra-low adesion*, ULA) de 24 poços (Cellstar® Greiner Bio-one, Kremsmünster, Áustria) em volume final de 400µl/poço. Em seguida, a placa contendo as células foi submetida ao campo magnético, primeiro usando um drive de concentração celular (Fig. 1 a/b) durante 3h, após este período o drive de concentração foi substituído por uma unidade de levitação que permaneceu durante todo o período de cultura (Fig. 1c/d/e). As culturas 3D foram submetidas a troca do meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina, a cada dois dias meio de cultura até o momento de uso.



3.5.2. Amostras de sangue

As amostras de sangue dos participantes foram coletadas com tubos de coleta de sangue a vácuo de 9 mL contendo heparina sódica (Vacuette®, Campinas, Brasil). As CMSPs foram isoladas por centrifugação em gradiente, utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), seguido por duas lavagens com PBS (centrifugação a 600 g/5 min). A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer usando solução de ácido acético (2% em PBS) e o método de exclusão de azul tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade.

3.5.3. Cocultivo tridimensional de CAISMOV24 e linfócitos

As CMSPs suspensas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina foram conjugadas com NanoShuttles™ misturando-as na proporção de 20.000 células viáveis a 1µl da nanopartícula em um tubo cônico. Posteriormente, a suspensão de CMSPs foi submetida a três ciclos de centrifugação e ressuspensão (30g/5 min), pipetando as células para cima e para baixo (pelo menos 10 vezes), sem alterar o meio. O frasco de cultivo 2D de CAISMOV24 foi incubado com NanoShuttle™, na proporção de 1µl de NanoShuttle™ para cada 20.000 a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. Em seguida, as células foram desprendidas do frasco de cultivo por meio de incubação com 5mL de tripsina por 5 minutos, a tripsina foi retirada por meio de duas lavagens (centrifugação 600g/5min) com PBS. As células foram suspensas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina. A viabilidade celular foi determinada por coloração azul de tripan e a densidade foi ajustada para 10⁶ células/mL. Em seguida, CMSPs conjugadas com NanoShuttle™ e células CAISMOV24 conjugadas com NanoShuttle™ foram misturadas na proporção de células de 1:5 (CMSP:CAISMOV24) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina. Tal suspensão celular foi distribuída em placa ULA de 24 poços, totalizando 1,2x10⁵/poço (20.000 CMSP e 100.000 CAISMOV24) em volume final de 400µL/poço. Em seguida, a placa contendo as células foi submetida ao campo magnético, primeiro usando um drive de concentração celular durante 3h, que foi seguido por uma unidade de levitação que permaneceu durante todo o período de cultura (72 horas) (Figura1). Os cocultivos foram mantidos em incubação a 37°C e 5% CO₂, a troca do meio de cultura foi feita a cada dois dias. Os cocultivos foram tratados diariamente com IL-15 (60 ng/mL concentração final/poço, BD, San Jose, EUA), como controle experimental diariamente ou não. Além disso, as placas de cultura também possuíam poços contendo CMSPs conjugados com NanoShuttle™, tratados ou não com IL-15, como controle experimental.

Para a visualização de linfócitos nos cocultivos foi realizado um experimento no qual CMSPs foram incubadas com corante de proliferação celular CellTrace™(CFSE) (ThermoFisher Scientific, Eugene, USA). Neste experimento o corante CFSE foi empregado para atribuir cor aos linfócitos já que este confere coloração esverdeada às células. Desta forma, quando visualizados em microscópio óptico os linfócitos apresentariam coloração verde. Resumidamente, CMSPs após tratamento com Nanoshuttle™, foram incubadas com CFSE 2μM a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ cél./mL por 15 minutos a 37°C e 5% CO₂. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS e suspensas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina. Células CAISMOV24 conjugadas com NanoShuttle™ foram misturadas com CMSPs coradas com CFSE na proporção de células de 1:5 (CMSP:CAISMOV24) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina. Tal suspensão celular foi distribuída em placa ULA de 24 poços, totalizando $1,2 \times 10^5$ /poço (20.000 CMSP e 100.000 CAISMOV24) em volume final de 400μL/poço. Em seguida, a placa contendo as células foi submetida ao campo magnético, primeiro usando um drive de concentração celular durante 3h, que foi seguido por uma unidade de levitação que permaneceu durante todo o período de cultura (72 horas).

3.5.4. Análise histológica e imuno-histoquímica

Cortes histológicos foram obtidos para determinar a histologia dos agregados celulares, expressão de biomarcadores e a presença de linfócitos. Para a determinação da histologia os cortes foram obtidos de tecido embebido em parafina seguindo os procedimentos rotineiros do laboratório de Patologia Especializada (LAPE) do CAISM, UNICAMP. Resumidamente, os agregados celulares foram fixados em formalina a 4%, desidratados por meio de diferentes concentrações de álcoois, embebidos em parafina, e então cortados em seções de 4μm. Os cortes foram montados em lâminas silanizadas (Perfecta Lab. São Paulo, Brasil) e armazenados até o momento de uso. Para a etapa de coloração com H&E, os cortes foram desparafinados em xileno, reidratados com álcool e/ou PBS, secos e posteriormente corados com H&E.

A expressão dos biomarcadores PAX8, receptor de estrógeno e receptor de progesterona bem como a presença de linfócitos nos agregados foram avaliadas por imunohistoquímica a partir de cortes histológicos obtidos por congelamento em nitrogênio líquido. Resumidamente, uma série de cortes consecutivos de 4μm obtidos em criostato (Cryostat CM 1850, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) foram colocados em lâminas silanizadas. Os cortes de agregados celulares nas lâminas foram fixados com acetona por 15

minutos, lavados com PBS e incubados em diluições apropriadas dos anticorpos primários (PAX8 clone BC12, control no. 901-438-070919, dil.1:100; receptor de estrógeno clone 1D5, control no. 901-054-081817, dil. 1:200; receptor de estrógeno clone 16, control no. 903-424-020818, dil. 1:200, Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) e anticorpo secundário conjugado a peroxidase, seguindo os procedimentos do Departamento de Anatomo-patologia da UNICAMP.

A presença de linfócitos nos agregados celulares resultantes do cocultivo de CAISMOV24 com CMSPs marcadas com corante fluorescente CFSE foi avaliada em cortes histológicos obtidos por congelação. Uma série de cortes consecutivos de 4µm foram colocados em lâminas silanizadas. Os cortes de agregados celulares nas lâminas foram fixados com acetona por 15 minutos, lavados com PBS, incubados em solução de permeabilização (Na₃C₆O₇ 0,0387M com 1% de Triton X-100) por 2 minutos, lavados novamente e corados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol, (DAPI, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) por 5 minutos (DAPI, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Os cortes na lâmina foram cobertos com meio de montagem e lâmina de microscópio. O exame microscópico foi realizado em microscopia de fluorescência (Nikon® Eclipse 80i, Tóquio, Japão; com filtros LP 430nm e 510nm). As lâminas contendo os cortes foram marcadas com corante fluorescente para DNA (DAPI). Resumidamente, para a coloração com DAPI as lâminas foram fixadas com acetona resfriada a -20°C por 15 minutos, lavadas 3 vezes com PBS 0,1x, incubadas com tampão de permeabilização aquecido a 37°C por 2 minutos (Citrato de sódio 0,3mM e X triton 0,01x), e marcadas com DAPI a uma diluição de 1:1000 por 5 minutos no escuro.

3.5.5. Fenotipificação de linfócitos

A presença dos linfócitos nos agregados celulares gerados com células CAISMOV24 e CMSPs foi determinada a partir de análise das suspensões celulares obtidas dos cocultivos em citometria de fluxo. Para este procedimento, seis agregados celulares obtidos sob as mesmas condições de cultura foram agrupados e submetidos à desagregação celular por pipetagem para cima e para baixo. A suspensão celular foi lavada por com PBS (centrifugação 600g/5min) em seguida, suspendidas e incubadas com 50µL de solução contendo anticorpos monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes para determinar subpopulações de linfócitos T (PBS com 2% de SFB e 0,2mM de EDTA e anticorpos monoclonais conjugados com fluoróforos). Os anticorpos utilizados foram: anti-CD3 APC-H7 (clone SK7), anti-CD56 PE-Cy7 (clone B159), anti-CD4 PerCP-Cy5.5 (clone SK3), anti-CD8 BV421 (clone 3G8),

anti-CD25 BB515 (clone 2A3) e anti-CD127 Alexa Fluor647 (clone HIL-7R-M21). As células foram incubadas por 30min sob gelo e protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e os sedimentos finais suspensos com 300µL de PBS para aquisição em citometro de fluxo FACS Verse (BD, San Jose, EUA). O software FlowJo™ foi usado para análise dos dados. A população de linfócitos foi identificada e delimitada usando os parâmetros FSC e SSC, e a FSC-área vs. FSC-altura foi utilizada para eliminar células agrupadas. As subpopulações de linfócitos T foram identificadas pela presença e/ou ausência de anticorpos específicos. Linfócitos NK foram identificados pela presença do anticorpo anti-CD56 PE-Cy7 e ausência do anticorpo anti-CD3 APC-H7. Os linfócitos TCD3⁺ foram identificados pela presença do anticorpo anti-CD3 APC-H7. A partir dos linfócitos TCD3⁺ foi identificada a população de linfócitos TCD4⁺ pela presença do anticorpo anti-CD4 PerCP-Cy5.5 enquanto que a população de linfócitos TCD8⁺ foi determinada pela presença do anticorpo anti-CD8 BV421. Além disso a partir da população de linfócitos TCD4⁺ foi identificada a população T-reg pela presença do anticorpo anti-CD25 BB515 e ausência do anticorpo anti-CD127 Alexa Fluor647.A

3.5.6. Cinética de crescimento em cultura 2D e 3D da CAISMOV24

A divisão celular de células CAISMOV24 em culturas 2D foi avaliada por citometria de fluxo nos cultivos 2D e 3D. Para isso, as células CAISMOV24 foram marcadas com o corante de proliferação celular violeta 450 (VPD450) (BD Horizon™, San Diego, EUA). Este corante não fluorescente se difunde pela membrana das células, as células viáveis clivam o VPD450 que passa a ser fluorescente. VPD450 de células não viáveis permanece não fluorescente. À medida que as células viáveis se dividem, o corante VPD450 é distribuído uniformemente entre as células filhas; cada célula-filha retém aproximadamente metade da intensidade de fluorescência de VPD450 de sua célula-mãe, ou seja, quanto mais as células se dividem menor a intensidade de fluorescência em cada uma delas. Em relação à marcação, para o cultivo 2D, 2x10⁶ CAISMOV24 foram incubadas com VPD450 a 0,1mM por 15 minutos a 37°C e 5% CO₂, em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS (centrifugação 600g/5min), resuspendidas com meio RPMI, lançadas em frascos de cultura que foram incubados por cinco dias a 37°C e 5% CO₂. Para o cultivo 3D, após tratamento com Nanoshuttle™, 2x10⁶ CAISMOV24 foram incubadas com VPD450 a 0,1mM por 15 minutos a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS (centrifugação 600g/5min) e os sedimentos finais suspensos com meio de cultura RPMI. O cultivo 3D foi realizado como descrito no tópico 3.7.1.

Após cinco dias de cultivo, a cultura 2D foi submetida a tratamento com 5mL de tripsina por 5 minutos para o desprendimento das células, a tripsina foi retirada com duas lavagens com PBS (centrifugação 600g/5min). O sedimento celular foi suspenso em 300µL para ser adquirido no citômetro FACS Verse. Para o cultivo 3D, seis agregados celulares formados foram agrupados e submetidos à desagregação celular por pipetagem para cima e para baixo. Subsequentemente, as suspensões de células 2D e 3D foram adquiridas por citômetro FACS Verse e analisadas por FACS Suite. As suspensões de células foram analisadas ajustando as células de tumor SSC/FSC apropriadas e tendo em conta a intensidade de fluorescência no dia zero em células marcadas e não marcadas com VPD450. A plataforma de proliferação do software FlowJo 7.1 (Tree Star, Ashland, EUA) foi utilizada para a análise dos dados. O índice de proliferação foi calculado pelo número de células submetidas em pelo menos uma divisão.

3.6. Variáveis e Conceitos

Variáveis independentes

1. Cultivo 3D: sistema de cultivo que promove a agregação celular formando estruturas tridimensionais.
2. Cultivo 2D: sistema de cultivo que promove o crescimento celular como monocamada aderida sobre uma superfície.

Variáveis dependentes

1. Proliferação celular: Calculada dividindo o número total de divisões celulares pelo número de células que entram em divisão pelo menos uma vez. Determinada pelo corante de proliferação celular VPD450 por meio do cálculo do índice de proliferação celular. O índice de proliferação celular é calculado Variável quantitativa contínua.
2. Expressão de moléculas de superfície celular: variável quantitativa contínua. Determinada pela frequência de células que expressam a molécula de superfície celular no total de células avaliadas.
3. Intensidade de expressão de moléculas de superfície celular: variável quantitativa, definida pela intensidade de fluorescência emitida por uma determinada molécula presente na superfície celular. Avaliada por meio da citometria de fluxo.
4. Presença de linfócitos nos agregados celulares: variável qualitativa e quantitativa definida pela presença ou ausência de linfócitos incorporados nos agregados após o cocultivo

com células da linhagem CAISMOV24. Avaliada por microscopia ótica de cortes histológicos e citometria de fluxo.

5. Subpopulações de linfócitos: variável qualitativa e quantitativa, definida pelo conjunto de moléculas de superfície celular expressas pelas células T: Avaliada por meio da citometria de fluxo.

Variáveis descritivas

1. Formação de agregados celulares: agrupamento de células obtido por meio de cultivo 3D. A formação de agregados celulares será afirmativa quando o mesmo for visualizado a olho nu, em placa de cultivo, e confirmado por microscopia ótica.

2. Caracterização histológica: Agregados celulares com organização celular compatível com a dos tumores epiteliais serosos de ovário avaliada por meio da microscopia ótica e de cortes histológicos.

3.7. Processamento e análise dos dados

Os dados numéricos obtidos foram digitados em uma planilha Excel (Microsoft Office, EUA) gerando um banco de dados. Posteriormente, os dados deste banco de dados foram usados pelo programa Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, CA, EUA) para análise estatística.

Os dados numéricos apresentados em percentual foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Dunnet's para múltiplas comparações. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados numéricos relativos à recuperação de linfócitos foram submetidos a um teste t não pareado para comparação de dois grupos específicos não pareados. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, EUA).

Os dados descritivos obtidos foram registrados por microscópio ótico equipado com contraste de fase. As imagens geradas foram nomeadas para eventual rastreio e arquivadas. Os dados descritivos foram avaliados por médico patologista.

3.8. Controle de qualidade

Neste projeto, o controle de qualidade dos procedimentos baseados na citometria de fluxo foi realizado por meio da calibração do equipamento segundo procedimentos recomendados pelo fabricante e padronizados no laboratório onde foram processados os ensaios. Para isso foram utilizadas suspensões de micro-esferas com tamanhos padronizados e

conjugadas à fluoróforos (Esferas de calibração CS&T da BD FACSuite código 650622). Além disso, todos os procedimentos foram realizados com repetições das amostras e ensaios que receberam imunoglobulinas inespecíficas conjugadas aos fluoróforos (controle isotipo) para detecção de possíveis reações inespecíficas. Sempre que possível foram incluídos nos ensaios controles positivos ou negativos constituídos por amostras de células cujo padrão de expressão de moléculas de superfície celular é conhecido.

3.9. Aspectos éticos

Os participantes deste estudo, só foram incluídos após serem esclarecidos sobre o propósito do estudo e consentirem por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os riscos e ou desconfortos previstos são mínimos e envolvem o procedimento de coleta do sangue por punção da veia do braço. Há, ainda, riscos associados ao sigilo da identidade do participante, todavia, foram adotados procedimentos de codificação das amostras e limites de acesso às informações dos participantes. Assim, foi garantido o anonimato das participantes do estudo, bem como, todos os direitos apontados na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e os princípios éticos propostos na declaração de Helsinki (revisado em 2013).

4. RESULTADOS

O resultado desta dissertação é apresentado como artigo intitulado *Three-dimensional cell culture to assembly low-grade ovarian carcinoma cell aggregates containing lymphocytes*. O manuscrito foi submetido à revista *Cells* do grupo MDPI em agosto de 2019, publicado em 2020 e encontra-se disponível no PubMed doi: 10.3390/cells9030635.



Article

Three-Dimensional Cell Culture Based on Magnetic Fields to Assemble Low-Grade Ovarian Carcinoma Cell Aggregates Containing Lymphocytes

Caroline Natânia de Souza-Araújo ¹, Cláudia Rodrigues Tonetti ¹, Marcella Regina Cardoso ¹ ,
Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade ¹, Rodrigo Fernandes da Silva ¹ ,
Luís Gustavo Romani Fernandes ¹ and Fernando Guimarães ^{1,2,*}

¹ School of Medicine, University of Campinas, 13083-887 Campinas, SP, Brasil; caroline.natania@yahoo.com.br (C.N.d.S.-A.); claudinha.tonetti@gmail.com (C.R.T.); macardoso86@hotmail.com (M.R.C.); lucci@unicamp.br (L.A.L.d.A.A.); rodrigoiverson@hotmail.com (R.F.d.S.); lgrf@fcm.unicamp.br (L.G.R.F.)

² Women's Hospital José Aristodemio Pinotti-Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), University of Campinas, 13083-881 Campinas, SP, Brasil

* Correspondence: fernando@caism.unicamp.br; Tel.: +55-19-35219462

Received: 20 February 2020; Accepted: 2 March 2020; Published: 6 March 2020



Abstract: There is a limited number of established ovarian cancer cell lines matching the low-grade serous histotype available for research purposes. Three-dimensional (3D) culture systems provide in vitro models with better tissue-like characteristics than two-dimensional (2D) systems. The goal in the study was to characterize the growth of a given low-grade serous ovarian carcinoma cell line in a 3D culture system conducted in a magnetic field. Moreover, the culture system was evaluated in respect to the assembly of malignant cell aggregates containing lymphocytes. CAISMOV24 cell line alone or mixed with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured using a commercially available 3D culture system designed for 24 well plates. Resulting cell aggregates revealed the intrinsic capacity of CAISMOV24 cells to assemble structures morphologically defined as papillary, and reflected molecular characteristics usually found in ovarian carcinomas. The contents of lymphocytes into co-cultured cell aggregates were significantly higher ($p < 0.05$) when NanoShuttle-conjugated PBMC were employed compared with non-conjugated PBMC. Moreover, lymphocyte subsets NK, T-CD4, T-CD8 and T-regulatory were successfully retrieved from co-cultured cell aggregates at 72h. Thus, the culture system allowed CAISMOV24 cell line to develop papillary-like cell aggregates containing lymphocytes.

Keywords: CAISMOV24 cell line; 3D culture; cell aggregate; tumor microenvironment

1. Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) is among the most lethal gynecological malignancies, ranking third as a cause of women's worldwide deaths. Surgery can cure most treated women when the malignancy is still restricted to the ovaries, but 79% of women with EOC are diagnosed at advanced stages, resulting in a poor five years survival rate of 20–25% [1–3]. Late diagnosis is a consequence of asymptomatic initial development and an absence of specific biomarkers for the early detection of EOC. Abdominal bloating or pain are frequently the first symptoms of EOC, which are commonly associated with ascites and metastases beyond the ovaries [4–6]. Ninety percent of the ovarian malignancies are of epithelial origin and comprise four main histotypes. EOCs are further categorized based on their growth and molecular characteristics as type I or II. The serous histotype comprises 70% of all EOC, among which the type II or high-grade, accounts for two-thirds of all ovarian cancer deaths [7–9].

Although the type I or low-grade serous tumors are less frequent than high-grade tumors, women with advanced or recurrent low-grade serous carcinomas have similar survival rate as women with high-grade tumors [10–12].

Different malignant cell lines are widely employed in cancer research, and although, more than hundred established cell lines from ovarian origin are currently known, a limited number of them are well characterized as in vitro models [13–16]. Moreover, some of the cell lines commonly used as experimental models do not resemble their cognate tumor [17,18]. Finally, the majority of cell lines established from serous histotype comprises the high-grade subtype, being rare to find cell lines from low-grade subtype of serous ovarian carcinoma [10]. Thus, well-characterized cell lines, as well as culture systems that preserve the histological and molecular characteristics of ovarian neoplasms are needed, particularly, those of low-grade subtype. Our group recently established a new human EOC cell line named CAISMOV24, which spontaneously immortalized in vitro from malignant cells obtained from ascites associated with a low-grade serous adenocarcinoma of the ovary. CAISMOV24 cell line harbors the *KRAS* mutation without *TP53* mutations, which is relatively frequent in low-grade serous histotype [19].

Most of the studies on human EOC using in vitro models were based on two-dimensional (2D) cell cultures. Accordingly, cells of epithelial origin grow adhered to the plastic surface of the culture flask, resulting in a cell monolayer [13]. Although 2D cell culture has allowed acquisition of knowledge about tumor biology, its usefulness is limited because it does not reproduce tissue complexity, making the cells vulnerable to morphological and functional alterations. Nevertheless, three-dimensional (3D) cell cultures provide in vitro models with improved tissue-like characteristics, placing them between the in vitro 2D models and the in vivo models [20–22]. 3D culture furnishes in vitro models to study the interaction between malignant cells and extracellular matrix, mechanisms of malignant invasion, susceptibility and resistance of malignant cells to drugs [23–27]. Recently, standardized high-throughput 3D culture systems have become commercially available, raising questions on whether they would be useful for studies on the interactions of immune cells in the tumor microenvironment.

There is a consensus that tumor infiltrating lymphocytes, as well as their cytokines, have prognostic value on ovarian cancer. Hereupon, patients with tumor infiltration of the T-CD8 subset have been associated with better treatment outcome, while the T-regulatory subset with worse responses [28–31]. All biological aspects of lymphocytes are modulated by cytokines, and cytokines such as IL-2 and IL-15 have partially overlapping properties being implicated in lymphocytes development, survival and cytotoxicity [32,33]. Although, both cytokines are primarily stimulators, the lymphocyte response to IL-2 can cause long term inhibitory effects due to activation of the T-regulatory (T-reg) lymphocyte subset, while IL-15 doesn't have this effect [33]. Thus, our goal in this study was to characterize the growth of a given low-grade serous ovarian carcinoma cell line in a 3D culture system commercially available, which is based on the use of magnetic field to induce cell aggregation, and evaluate the culture system in respect to the assembly of malignant cell aggregates containing lymphocytes.

2. Materials and Methods

2.1. Two and Three-Dimensional Cultures of CAISMOV24

The ovarian cancer cell line CAISMOV24 was maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 2 mM L-glutamine (Nutricell, Campinas, Brazil). Two-dimensional cell cultures were carried out by seeding 10^4 cells/cm² in culture flasks (JetBiofil, Guangzhou, China). Cultures were incubated at 37 °C, 5% CO₂, replenished with fresh medium every 2–3 days, and treated with trypsin/EDTA (Nutricell) for cell re-plating every 2 weeks. Three-dimensional (3D) cell cultures were carried out using the Bio-Assembler™ kit designed for 24 well plates (n3D-Biosciences Inc, Houston, TX, USA). In short, NanoShuttles™ were added in a T-25 flask with a ratio of 1 µL of NanoShuttles™ per 20,000 cells and incubated at 37 °C and 5% CO₂ overnight. Then, the cells were detached by treating them with 5 mL of trypsin for 5 min and washed by centrifugation (600 g/5 min).

with balanced salt solution (PBS, Nutricell). Cell viability was determined by trypan blue (1% *w/v* in PBS) exclusion method and density adjusted to 10^6 cells/mL in RPMI-1640 supplemented medium. CAISMOV24 cells conjugated with NanoShuttlesTM were seeded in 24-well ultralow-attachment plate (ULA, Cellstar[®] Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) at 10^5 cells and final volume of 400 μ L/well. The 3D culture was achieved by incubating (37 °C and 5% CO₂) the plates under magnetic field, first using a bioprint drive for 3h, which was followed by a levitation drive for all culture period. This procedure promotes cells to grow as aggregates. 3D culture plate was replenished with fresh medium every 2 days until the moment of cell aggregate use.

2.2. Blood Samples

The blood samples of 7 healthy donors were collected using 9mL vacuum blood-sampling tubes containing sodium heparin (Vacuette[®], Campinas, Brazil). The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient centrifugation, using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), followed by a washing procedure performed twice (centrifuged 600 g/5 min) using a PBS. Cell numbers were assessed in a Neubauer chamber using acetic acid solution (2% in PBS) and the trypan blue exclusion method to assess viability.

2.3. Three-Dimensional Co-Cultures of CAISMOV24 and Lymphocytes

PBMCs were conjugated with NanoShuttlesTM by mixing them at a proportion of 20,000 viable cells to 1 μ L of the nanoparticle in a conical tube. Subsequently, PBMCs suspension were subjected to three cycles of centrifugation and resuspension (30 g/5 min), by pipetting the cells up and down (50 times), without changing the medium. CAISMOV24 cells were conjugated to NanoShuttleTM as aforementioned. NanoShuttleTM conjugated PBMCs and CAISMOV24 cells were seeded at 1:5 cell ratio in 24-well ultralow-attachment plate at 1.2×10^5 cells and final volume of 400 μ L/well. 3D culture was achieved by incubating (37 °C and 5% CO₂) the plates under magnetic field, first using a bioprint drive for 3h, which was followed by a levitation drive for all culture period. Co-cultured cell aggregates were either treated with IL-15 (60 ng/mL final concentration/well) daily or not. Additionally, culture plates also had wells containing PBMCs conjugated with NanoShuttleTM alone, either treated with IL-15 or not, as experiment controls. Additionally, 3D co-cultures were carried out using PBMCs labelled with carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE, Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). For cell labelling, PBMCs were incubated in 3 μ M CFSE-PBS solution at a density of 2.5×10^5 cells/mL for 15 min at 37 °C.

2.4. Histological Analysis and Immunohistochemistry

Cell aggregates of CAISMOV24 were either submitted to cryo-sections (Cryostat CM 1850, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) intended for immunohistochemistry analysis or fixed in 4% formalin and routinely processed to obtain histological sections from paraffin-embedded tissue. Briefly, immunohistochemistry was carried out from a series of consecutive cryosections (4 μ m) placed on silanized slides, which were fixed with acetone for 15 min, washed in PBS and incubated in appropriate dilutions of primary antibodies (PAX8 clone BC12, control no. 901-438-070919, dil. 1:100; estrogen receptor clone 1D5, control no. 901-054-081817, dil. 1:200; Progesterone receptor clone 16, control no. 903-424-020818, dil. 1:200, Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) and secondary peroxidase conjugated-antibody, following standard procedures of the Anatomopathology Department at the University of Campinas Hospital. Additionally, cell aggregates resulting from the co-culture of CAISMOV24 cells with CFSE-labelled PBMCs were submitted to cryo-sections. Cell aggregate cuts on slides were fixed with acetone for 15 min, washed with PBS, incubated in permeabilization solution (0.0387 M Na₃C₆O₇ with 1% Triton X-100) for 2 min, washed again, and finally, stained with 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride/5 min (DAPI, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Cuts on slide were covered with mounting medium and microscope slip. Microscope

examination was carried out in fluorescence microscopy (Eclipse 80i, Nikon®, Tokyo, Japan; with LP 430 nm and 510 nm filters).

2.5. Lymphocyte Phenotyping

Lymphocytes were recovered from the co-cultured cell aggregates and phenotyped for the identification of their subsets. For this procedure, six cell aggregates obtained under the same culture conditions were grouped to be processed together for cell disaggregation by up and down pipetting in staining solution (PBS with 2% SFB and 0.2 mM EDTA). The resulting single cell suspension was washed by centrifugation, and the final cell pellet suspended with staining solution to adjust cells density to 10^6 cells/mL. A flow cytometric-based assay was conducted according to standard procedures. Briefly, the 0.3×10^5 cells were mixed with 50 μ L of staining solution containing a mix of fluorophore-conjugated monoclonal antibodies at a 1:50 dilution: anti-CD3 APC-H7 (clone SK7), anti-CD4 PerCP-Cy5.5 (clone SK3), anti-CD25 BB515 (clone 2A3), anti-CD56 PE-Cy7 (clone B159), anti-CD127 Alexa Fluor647 (clone HIL-7R-M21) and anti-CD8 BV421 (clone 3G8) (BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA). Cells were incubated for 30 min on ice and protected from light. After the incubation, cells were washed twice with PBS and the final pellets suspended with 300 μ L PBS for acquisition on a FACS Verse flow cytometer using the FACSuite software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The FlowJo software was used for data analysis. The lymphocyte population was identified by the FSC and SSC parameters, and the FSC-Area vs. FSC-Height was used to eliminate doublets. Within the lymphocyte population, the CD3⁺ lymphocytes were identified by anti-CD3 APC-H7. Within the CD3⁺ lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ populations were identified as well. Within the CD4⁺ population, the T-reg population was identified by plotting anti-CD25 BB515 vs. anti-CD127 Alexa Fluor647.

2.6. CAISMOV24 2D and 3D in Vitro Growth Kinetics

Cell division of CAISMOV24 cells in 2D and 3D cultures was assessed by flow cytometry. For this end, CAISMOV24 cells were labelled with violet proliferation dye 450 (VPD450, BD Horizon™, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, prior being cultivated under 2D or 3D culture systems. At day five of 3D culture four to six cell aggregates of CAISMOV24 were grouped to be processed together for cell disaggregation. Simultaneously, CAISMOV24 cells from 2D culture flasks were treated with trypsin/EDTA for detachment and cell disaggregation. Subsequently, 2D and 3D cell suspensions were acquired in a FACS Verse with FACS Suite software. Cell suspensions were analyzed by setting the appropriate SSC-A/FSC-A gate on tumor cells and considering the fluorescence intensities on day 0 in VPD450 labelled and unlabeled cells. The proliferation platform of FlowJo software was used for the data analysis. The proliferation index was calculated by dividing the total number of divisions by the number of cells that underwent at least one division.

2.7. Statistics and Calculations

Multi-comparison analysis of variables was performed by ANOVA followed by a post hoc multiple comparison test. The level of significance was set at p -value < 0.05. The ratio of lymphocytes retrieved from cell aggregates was calculated by dividing the number of events detected within the SSC-A/FSC-A gate of CAISMOV24 cells by the number of events within the SSC-A/FSC-A gate of lymphocytes.

3. Results

3.1. 3D cultures and Proliferation Assays

Three dimensional cultures of CAISMOV24 cell line was followed by phase contrast microscopy and representative images are depicted in Figure 1. The first 3 h under magnetic field promoted by the bioprint drive brought CAISMOV24 cells together in a round-shaped structure. Subsequently, under magnetic field of the levitation drive, the initial rounded structure evolved irregularly, generating regions with variable amounts of aggregated cells and spindle-like elongated structures (Figure 1b,

24 h). The final arrangement of CAISMOV24 cells was morphologically defined as papillary, as revealed by histological analysis of the cell aggregates (Figure 1d). Histological cuts also revealed the presence of focal acinar arrangement with secreted material, pointing out that 3D culture system enabled CAISMOV24 cells to evolve glandular-like structures (Figure 1e). Finally, histological cuts of CAISMOV24 cell aggregates assessed by immunohistochemistry revealed diffuse nuclear expression of PAX8 and progesterone receptor, as well as absence of estrogen receptor expression (Figure 1f–h respectively). VPD450-stained CAISMOV24 cells assessed by flow cytometry showed that mean proliferation index of the cells maintained in 3D cultures (1.87 ± 0.15 times, $n = 7$) was significantly lower ($p < 0.0001$) than in the 2D cultures (3.14 ± 0.09 times, $n = 3$) (Figure 1i).

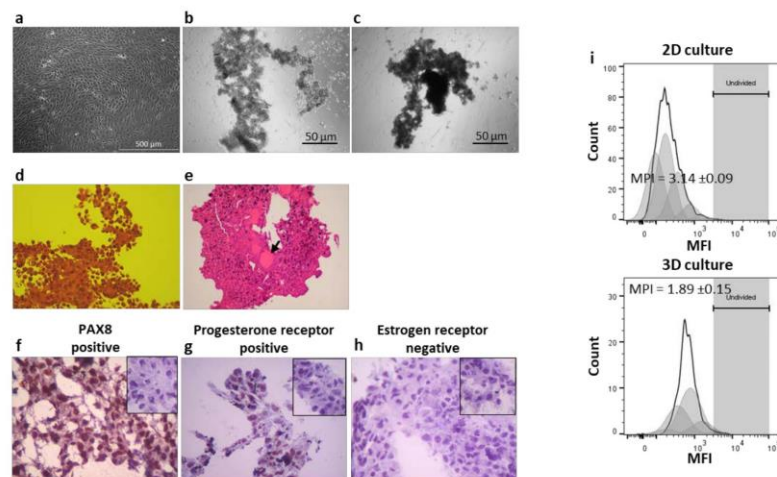


Figure 1. Analysis of morphological and histological features of the CAISMOV24 cells in 3D culture. Phase contrast microscopy of CAISMOV24 cells growing as (a) monolayer in 2D culture or growing as cell aggregates in 3D culture at (b) 24 h and (c) at 72 h. (d and e) Brightfield microscopy of histological cuts representative of CAISMOV24 cell aggregates ($n = 8$); (d) Histological cut showing papillary morphology of the cell aggregate (obj. 40x; H&E staining) and (e) the presence of focal acinar arrangement with secreted material (arrow; obj. 10x; H&E staining). Immunohistochemistry analysis of cryosections of 3D-cultured CAISMOV24 cells ($n = 6$ cell aggregates) showing nuclear expression of PAX8 (f) and progesterone receptor (g) in brown, as well as, absence of estrogen receptor (h) compared with their respective negative controls (insets); cells are counterstained with hematoxylin. (i) Proliferation profile of CAISMOV24 cells assessed by flow cytometry on day 5, following cell labeling with violet proliferation dye 450 (VPD450); shaded areas represent each of the new cell generations, which retained approximately half of the VPD450 fluorescence intensity of their parent cells. The mean proliferation index of CAISMOV24 cells was significant lower ($p < 0.0001$, t-student test) in 3D culture ($n = 7$ experimental repetitions) than in the 2D culture ($n = 3$). MPI = mean proliferation index.

3.2. CAISMOV24 Cell Aggregate Contents of Lymphocytes

Three dimensional co-cultures of CAISMOV24 cells with PBMCs (5:1 cell ratio respectively) resulted in aggregates of malignant cells containing lymphocytes. These cell aggregates evolved similarly to what was previously described for aggregates of CAISMOV24 cells alone. Moreover, PBMCs conjugated with NanoShuttle, which were maintained alone under the same 3D culture conditions for comparison purposes, showed the inability of leukocytes to generate aggregates.

The contents of lymphocytes within CAISMOV24 cell aggregates were assessed both by cell disaggregation followed by flow cytometry analysis as well as fluorescence microscopy. It was observed

that co-cultures performed with NanoShuttle-conjugated PBMCs had significantly higher ($p < 0.05$) percentages of CD3⁺ lymphocytes than those with non-conjugated PBMCs (Figure 2a,b). The presence of leukocytes within CAISMOV24 cell aggregates were confirmed by fluorescence microscopy of cryo-sections obtained from cell aggregates containing CFSE-labelled PBMCs (Figure 2c). The ratio of lymphocytes retrieved from cell aggregates were approximately 20:1 (CAISMOV24: lymphocyte) 72 h after co-culture initiation, being similar between in vitro cultures that were supplemented or not with IL-15 (Figure 2d).

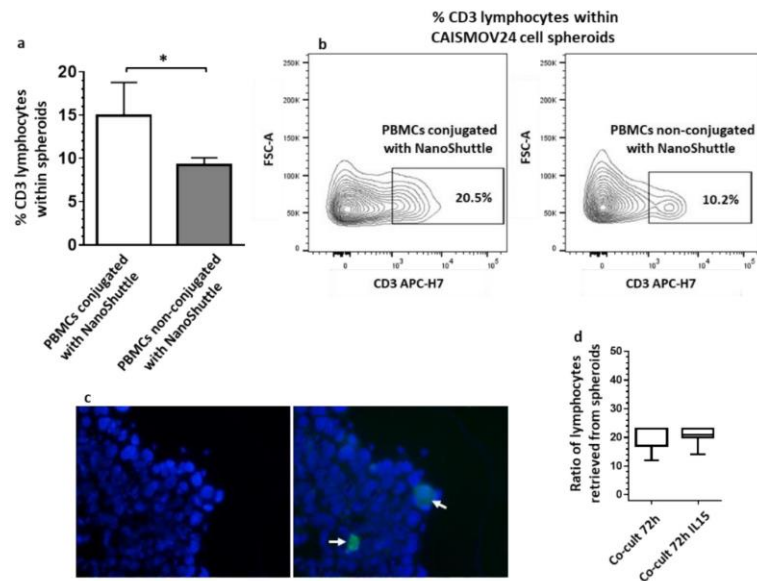


Figure 2. Analysis of the contents of lymphocytes in CAISMOV24 cell aggregates obtained by 3D co-culture of CAISMOV24 cells with PBMCs. (a) 3D co-cultures performed with NanoShuttle-conjugated PBMCs ($n = 6$ experimental repetitions) have significant ($* p < 0.05$) higher percentages of CD3 lymphocyte subset than co-cultures performed with PBMCs non-conjugated with NanoShuttle ($n = 3$ experimental repetitions). (b) Contour plots from a representative assay performed with NanoShuttle-conjugated and non-conjugated PBMCs from the same blood sample. (c) Fluorescence microscopy from a representative cryo-section of cell aggregates showing CFSE-labelled PBMCs (arrow). (d) The ratio of lymphocytes retrieved from cell aggregates is similar between co-cultures at 72 h that were supplemented or not with IL-15 ($n = 7$ experimental repetitions).

Furthermore, lymphocyte subsets were further assessed. Thus, Figure 3 shows the proportions of NK (CD3[−] CD56⁺) lymphocytes, as well as T lymphocytes and their subsets, T-CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺), T-CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) and T-reg (CD4⁺CD25⁺CD127[−]). Although, no significant differences were observed in the percentages of T-CD4⁺ and NK lymphocytes among the different culture conditions (Figure 3a,d), proportions of the T-CD8⁺ subset within the CD3⁺ lymphocytes decreased in CAISMOV24 cell aggregates, being significantly ($p < 0.05$) lower in co-cultures supplemented with IL-15 compared with PBMCs maintained in the same culture conditions (Figure 3b). In addition, the proportion of the T-reg subset within the CD4⁺ population was significantly higher ($p < 0.05$) in CAISMOV24 cell aggregates supplemented with IL-15 compared to PBMCs cultures (Figure 3c). Finally, it was observed an upregulation of the CD69 molecule on NK and CD8 lymphocytes retrieved from CAISMOV24 cell aggregates. In this context, CD69 upregulation on CD8⁺ lymphocytes was associated with

supplementation of the culture with IL-15 (Figure 3e,f), while on NK lymphocytes it was associated with presence of CAISMOV24 cells (Figure 3g,h).

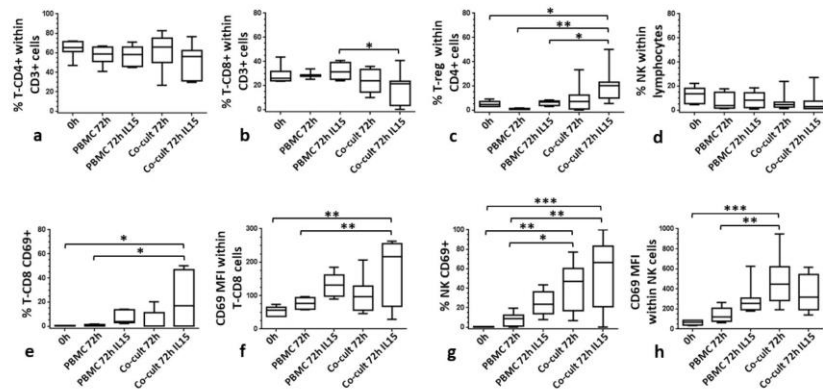


Figure 3. Comparison of the contents of lymphocyte subsets in CAISMOV24 cell aggregates obtained by 3D co-culture of CAISMOV24 cells with PBMCs. (a), (b) and (c) frequencies of T lymphocyte subsets T-CD4, T-CD8 and T-reg respectively, as well as (d) NK lymphocytes. (b) T-CD8+ subset is significantly lower ($p < 0.05$) in CAISMOV24 cell aggregates supplemented with IL-15 compared with PBMCs maintained in the same culture conditions. (c) T-reg subset is significantly higher ($p < 0.05$) in CAISMOV24 cell aggregates supplemented with IL-15 compared to PBMCs cultures. CD69 molecule is upregulated on NK and CD8 lymphocytes retrieved from CAISMOV24 cell aggregates. (e,f) CD69 upregulation on CD8+ lymphocytes is associated with supplementation of the culture with IL-15, while (g,h) on NK lymphocytes it was associated with presence of CAISMOV24 cells. Values were presented as whisker plots and medians ($n = 7$ experimental repetitions with different blood donors); statistical analyses were performed by ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Significant statistical differences are indicated with * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

4. Discussion

Studies using 3D cell cultures have increased over the past years. This fact is not only a consequence of the improved accuracy delivered by this cell culture approach, but it is also a result of the availability of new, simplified and high-throughput protocols. In this context, the present study successfully evaluated a commercially available 3D culture system to assemble low-grade serous ovarian carcinoma cell aggregates containing lymphocytes.

Frequently, 3D culture models of neoplasms, including EOC, are achieved by culturing tissue fragments, suspension of primary cells or cell lines upon a natural or synthetic polymer matrix [23–27,34,35]. Another way to generate 3D cultures of malignant cells is based on the use of ULA containers that prevent cell adhesion, which combined with suitable culture media and/or agitation promote the growth of epithelial cells as free cell aggregates [36–38]. New 3D cell culture technologies have combined magnetic field with ULA containers to promote aggregation of the cells that were previously conjugated with nanoparticles containing iron. This is the case of the n3D-Biosciences culture system, which was successfully employed to generate cell aggregates of different cell types, including stem and primary cells from humans, as well as other human malignant cells [39–41].

In regard to ovarian cancer cell lines, Lee and coworkers [42] used 31 cell lines to compare a 3D culture system based on synthetic polymer matrix with the 2D culture. Heredia-Soto and coworkers [43] recently standardized a 3D culture system employing ULA containers to generate cell aggregates with 16 cell lines. These studies included OAW42 and PEO16 respectively as the only cell lines of low-grade serous histotype. Finally, Pan and coworkers [44] employed the n3D-Biosciences system based on

magnetic field to evaluate the influence of microRNA on cell aggregation of six different ovarian cancer cell lines, all of them of high-grade. Cell aggregates obtained in these studies varied in their morphology, from round to irregular-elongated, and cell compaction, from dense to loose, showing that the 3D culture systems did not determine alone the final shape of the cell aggregates. Thus, as stated by Lee and coworkers, 3D culture allows cell lines to reveal certain histological differentiation, even after prolonged culture in 2D [42]. Correspondingly, our results suggested that aggregates of CAISMOV24 cells were shaped not only by the magnetic field, but also by the intrinsic capacity of the growing cells to organize their final arrangement. As a result, cell aggregates observed in our 3D cultures were consistent with the cytological pattern found in peritoneal lavages or ascites from patients with ovarian cancer, which are positive for the presence of malignant cells [45]. Moreover, histological analysis showed that CAISMOV24 cell aggregates displayed papillary morphology, and molecular phenotype consistent with functional EOC cells, particularly, it was detected nuclear expression of PAX8 molecule, which is a biomarker frequently reported occurring in low-grade serous ovarian cancer [35].

Similar to what was previously reported for other EOC cell lines [42,46], we observed that CAISMOV24 cell had a lower cell proliferation index in 3D culture compared with 2D. Such a decrease in cell proliferation would most likely be a consequence of inhibition by cell contact, which happens earlier in 3D cultures than in 2D. However, whether magnetic field would play a role on cell proliferation inhibition remain to be assessed. Although, studies have stated that weak magnetic field do not produce biological effects [39,47,48], there are data suggesting that exposure to magnetic field could specifically target highly proliferative cell populations, such as malignant cells [49,50].

Differently from 3D culture employing ULA plates alone, we hypothesized that since the Bio-Assembler™ kit combines magnetic field with ULA plates, it could enable to assembly of EOC cell aggregates containing lymphocytes. Correspondingly, our results showed that co-culture of CAISMOV24 cells with NanoShuttle™-conjugated PBMCs under magnetic field boosts significantly the contents of lymphocytes within EOC cell aggregates. Moreover, we demonstrated the feasibility of accessing different lymphocyte subsets within EOC cell aggregates, validating this 3D culture system as a useful in vitro approach to address lymphocyte interactions in EOC microenvironment.

Our results showed that cytotoxic cells (NKs and CD8 lymphocytes) were activated, and pointed the T-reg subtype as a long-term persistent lymphocyte present into the cell aggregates, in a sense similar to what have been shown in patients with EOC [51,52].

5. Conclusions

We conclude that the 3D culture system allowed CAISMOV24 cell line to develop papillary-like cell aggregates. The culture system also allowed retrieval of lymphocytes from cell aggregates obtained by co-culture of PBMCs and CAISMOV24 cell line. Thus, we assumed this 3D culture system suitable for the study of immune cell interactions in tumor microenvironment.

Author Contributions: C.N.d.S.-A., C.R.T. and F.G. designed the experiments. C.N.d.S.-A., C.R.T., M.R.C. and R.F.d.S. performed experiments. C.N.d.S.-A., C.R.T., R.F.d.S. and F.G. analyzed and interpreted the data. L.G.R.F. analyzed and interpreted the immune fluorescence analyses. L.A.L.d.A.A. analyzed and interpreted histopathological data. C.N.d.S.-A. and F.G. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from São Paulo Research Foundation – FAPESP. Financial supports numbers 2018/06959-1. Caroline Natânia de Souza-Araújo, Cláudia Rodrigues Tonetti, Marcella Regina Cardoso and Rodrigo Fernandes da Silva are beneficiaries of scholarships granted by CAPES. Funding agency did not participate in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Acknowledgments: Authors are thankful to Ana Cláudia Spararpani Piazza from Anatomopathological Department for the assistance with immunohistochemistry assay and to Geise Russano and the team of Experimental Pathology Laboratory for the assistance with histological slide preparation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Ethics Approval and Consent to Participate: The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Campinas (11, December 2017, #2.427.262) and was registered on the Brazilian National Health Council (CAAE: 79825417.4.0000.5404). Blood donors provided written informed consent for the use of their blood.

References

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, N.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2014**, *136*, E359–E386. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Vargas, A.N. *ecancermedalscience*. *Ecancermedalscience* **2014**, *8*. [\[CrossRef\]](#)
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Naora, H.; Montell, D.J. Ovarian Cancer Metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 355–366. [\[CrossRef\]](#)
5. Huang, H.; Li, Y.; Lan, C.Y.; Huang, Q.D.; Feng, Y.L.; Huang, Y.W.; Liu, J.H. Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma* **2013**, *60*, 546–552. [\[CrossRef\]](#)
6. Kim, S.; Kim, B.; Song, Y.S. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1173–1178. [\[CrossRef\]](#)
7. Ferreira, P.A.R.; Sallum, L.F.T.A.; Sarian, L.O.; Andrade, L.A.L.D.A.; Derchain, S. Carcinoma de ovário seroso e não seroso: Tipo histológico em relação ao grau de diferenciação e prognóstico. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet. RBGO Gynecol. Obstet.* **2012**, *34*, 196–202. [\[CrossRef\]](#)
8. Berns, E.M.J.J.; Bowtell, D. The Changing View of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2701–2704. [\[CrossRef\]](#)
9. Kurman, R.J.; Shih, I. The Dualistic model of ovarian carcinogenesis revisited, revised, and expanded. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 733–747. [\[CrossRef\]](#)
10. Fernández, M.L.; DiMattia, G.E.; Dawson, A.; Bamford, S.; Anderson, S.; Hennessy, B.T.; Anglesio, M.S.; Shepherd, T.G.; Salamanca, C.; Hoenisch, J.; et al. Differences in MEK inhibitor efficacy in molecularly characterized low-grade serous ovarian cancer cell lines. *Am. J. Cancer* **2016**, *6*, 2235–2251.
11. Okoye, E.; Euscher, E.D.; Malpica, A. Ovarian Low-grade Serous Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2016**, *40*, 627–635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ahn, G.; Folkins, A.K.; McKenney, J.K.; Longacre, T.A. Low-grade Serous Carcinoma of the Ovary. *Am. J. Surg. Pathol.* **2016**, *40*, 1165–1176. [\[CrossRef\]](#)
13. Thériault, B.L.; Portelance, L.; Mes-Masson, A.-M.; Nachtigal, M. Establishment of Primary Cultures from Ovarian Tumor Tissue and Ascites Fluid. *Adv. Struct. Saf. Stud.* **2013**, *1049*, 323–336.
14. Chen, J.; Wang, J.; Zhang, Y.; Chen, D.; Yang, C.; Kai, C.; Wang, X.; Shi, F.; Dou, J. Observation of ovarian cancer stem cell behavior and investigation of potential mechanisms of drug resistance in three-dimensional cell culture. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *118*, 214–222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Giri, S.; Rattan, R.; Deshpande, M.; Maguire, J.L.; Johnson, Z.; Graham, R.P.; Shridhar, V. Preclinical Therapeutic Potential of a Nitrosylating Agent in the Treatment of Ovarian Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97897. [\[CrossRef\]](#)
16. Jacob, F.; Nixdorf, S.; Hacker, N.F.; Heinzelmann-Schwarz, V. Reliable in vitro studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *J. Ovarian Res.* **2014**, *7*, 60. [\[CrossRef\]](#)
17. Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A.A.; Kim, S.; Wilson, C.; Lehár, J.; Kryukov, G.; Sonkin, D.; et al. Addendum: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **2018**, *565*, E5–E6. [\[CrossRef\]](#)
18. Domcke, S.; Sinha, R.; Levine, D.A.; Sander, C.; Schultz, N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2126. [\[CrossRef\]](#)
19. Da Silva, R.; Cardozo, D.M.; Rodrigues, G.O.L.; De Souza-Araújo, C.N.; Migita, N.A.; Andrade, L.A.L.D.A.; Derchain, S.; Yunes, J.A.; Guimaraes, F. CAISMOV24, a new human low-grade serous ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 756. [\[CrossRef\]](#)
20. Kim, J. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*, 365–377. [\[CrossRef\]](#)

21. Yamada, K.M.; Cukierman, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell* **2007**, *130*, 601–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Freire, D. Os jardins suspensos das células. *Pesqui. FAPESP* **2017**, *254*, 58–61.
23. Xu, F.; Celli, J.; Rizvi, I.; Moon, S.; Hasan, T.; Demirci, U. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 204–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Loessner, D.; Holzapfel, B.M.; Clements, J.A. Engineered microenvironments provide new insights into ovarian and prostate cancer progression and drug responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *79*, 193–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Augustine, T.; Dix-Peek, T.; Duarte, R.; Candy, G.P. Establishment of a heterotypic 3D culture system to evaluate the interaction of TREG lymphocytes and NK cells with breast cancer. *J. Immunol. Methods* **2015**, *426*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hirt, C.; Papadimitropoulos, A.; Mele, V.; Muraro, M.G.; Mengus, C.; Iezzi, G.; Terracciano, L.; Martin, I.; Spagnoli, G.C. “In vitro” 3D models of tumor-immune system interaction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *79*, 145–154. [[CrossRef](#)]
27. Aihara, A.; Abe, N.; Saruhashi, K.; Kanaki, T.; Nishino, T. Novel 3-D cell culture system for in vitro evaluation of anticancer drugs under anchorage-independent conditions. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1858–1866. [[CrossRef](#)]
28. Gavalas, N.G.; Karadimou, A.; Dimopoulos, M.A.; Bamias, A. Immune Response in Ovarian Cancer: How Is the Immune System Involved in Prognosis and Therapy: Potential for Treatment Utilization. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, *2010*, 791603. [[CrossRef](#)]
29. Hwang, W.-T.; Adams, S.F.; Tahirovic, E.; Hagemann, I.; Coukos, G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *124*, 192–198. [[CrossRef](#)]
30. Curiel, T.J.; Coukos, G.; Zou, L.; Alvarez, X.; Cheng, P.; Mottram, P.; Evdemon-Hogan, M.; Conejo-Garcia, J.R.; Zhang, L.; Burow, M.; et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 942–949. [[CrossRef](#)]
31. Ghiringhelli, F.; Meénard, C.; Terme, M.; Flament, C.; Taieb, J.; Chaput, N.; Puig, P.E.; Novault, S.; Escudier, B.; Vivier, E.; et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 1075–1085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Huntington, N.D. The unconventional expression of IL-15 and its role in NK cell homeostasis. *Immunol. Cell Biol.* **2014**, *92*, 210–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fehniger, T.A.; Cooper, M.; Caligiuri, M.A. Interleukin-2 and interleukin-15: Immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 169–183. [[CrossRef](#)]
34. White, E.A.; Kenny, H.A.; Lengyel, E. Three-dimensional modeling of ovarian cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *79*, 184–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kopper, O.; De Witte, C.J.; Löhmusaar, K.; Valle-Inclán, J.E.; Hami, N.; Kester, L.; Balgobind, A.V.; Korving, J.; Proost, N.; Begthel, H.; et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 838–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yuhas, J.M.; Li, A.P.; Martinez, A.O.; Ladman, A.J. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **1997**, *37*, 3639–3643.
37. Casey, R.C.; Burleson, K.M.; Skubitz, K.M.; Pambuccian, S.E.; Oegema, T.R.; Ruff, L.E.; Skubitz, A.P.N. β 1-Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 2071–2080. [[CrossRef](#)]
38. Weiswald, L.-B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **2015**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)]
39. Haisler, W.L.; Timm, D.M.; Gage, J.A.; Tseng, H.; Killian, T.C.; Souza, G.R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1940–1949. [[CrossRef](#)]
40. Guo, W.M.; Loh, X.J.; Tan, E.Y.; Loo, J.; Ho, V.H.B. Development of a Magnetic 3D Spheroid Platform with Potential Application for High-Throughput Drug Screening. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2182–2189. [[CrossRef](#)]
41. Du, V.; Luciani, N.; Richard, S.; Mary, G.; Gay, C.; Mazuel, F.; Reffay, M.; Ménasché, P.; Agbulut, O.; Wilhelm, C. A 3D magnetic tissue stretcher for remote mechanical control of embryonic stem cell differentiation. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lee, J.M.; Mhawech-Fauceglia, P.; Lee, N.; Parsanian, L.C.; Lin, Y.G.; Gayther, S.A.; Lawrenson, K. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab. Investig.* **2013**, *93*, 528–542. [[PubMed](#)]

43. Heredia-Soto, V.; Redondo, A.; Berjón, A.; Miguel-Martín, M.; Díaz, E.; Crespo, R.; Hernández, A.; Yébenes, L.; Gallego, A.; Feliu, J.; et al. High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical model of disease. *Oncotarget* **2018**, *9*, 21893–21903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pan, Y.; Robertson, G.; Pedersen, L.; Lim, E.; Hernandez-Herrera, A.; Rowat, A.M.; Patil, S.L.; Chan, C.K.; Wen, Y.; Zhang, X.; et al. miR-509-3p is clinically significant and strongly attenuates cellular migration and multi-cellular spheroids in ovarian cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 25930–25948.
45. Shield, P. Peritoneal washing cytology. *Cytopathology* **2014**, *15*, 131–141. [[CrossRef](#)]
46. Lawrenson, K.; Notaridou, M.; Lee, N.; Benjamin, E.; Jacobs, I.; Jones, C.; Gayther, S.A. In vitro three-dimensional modeling of fallopian tube secretory epithelial cells. *BMC Cell Boil.* **2013**, *14*, 43. [[CrossRef](#)]
47. Tseng, H.; Gage, J.A.; Raphael, R.M.; Moore, R.H.; Killian, T.C.; Grande-Allen, K.J.; Souza, G.R. Assembly of a Three-Dimensional Multitype Bronchiole Coculture Model Using Magnetic Levitation. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19*, 665–675. [[CrossRef](#)]
48. Hore, P.J. Are biochemical reactions affected by weak magnetic fields? *PNAS* **2012**, *109*, 1357–1358. [[CrossRef](#)]
49. Van Huizen, A.V.; Morton, J.M.; Kinsey, L.J.; Von Kannon, D.G.; Saad, M.A.; Birkholz, T.R.; Czajka, J.M.; Cyrus, J.; Barnes, F.S.; Beane, W.S. Weak magnetic fields alter stem cell-mediated growth. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau7201. [[CrossRef](#)]
50. Martino, C.F.; Portelli, L.; McCabe, K.; Hernandez, M.; Barnes, F. Reduction of the Earth's magnetic field inhibits growth rates of model cancer cell lines. *Bioelectromagnetics* **2010**, *31*, 649–655. [[CrossRef](#)]
51. Landskron, J.; Helland, Ø.; Torgersen, K.M.; Aandahl, E.M.; Gjertsen, B.T.; Bjørge, L.; Tasken, K. Activated regulatory and memory T-cells accumulate in malignant ascites from ovarian carcinoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **2014**, *64*, 337–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Da Silva, R.; Yoshida, A.; Cardozo, D.M.; Jales, R.M.; Paust, S.; Derchain, S.; Guimaraes, F. Natural Killer Cells Response to IL-2 Stimulation Is Distinct between Ascites with the Presence or Absence of Malignant Cells in Ovarian Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5. DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos tem aumentado o número de estudos utilizando o cultivo 3D com linhagens celulares neoplásicas para o estudo de biologia tumoral, inclusive com linhagens de carcinoma de ovário. (28,29,47). Esse fato se deve tanto a maior acurácia /dos modelos 3D como o desenvolvimento de novos protocolos simplificados e de maior produtividade.

Em geral, modelos neoplásicos 3D *in vitro* são obtidos por meio do cultivo de linhagens celulares sobre um suporte polimérico. Lee e coautores (48), por exemplo, compararam os sistemas de cultivo 2D e 3D utilizando matriz sintética (PolyHema) com 31 linhagens de carcinoma de ovário, entre as quais predominaram linhagens de alto grau e apenas uma correspondendo ao histotipo seroso de baixo grau (OAW42). Outra abordagem adotada nos modelos 3D é geração de agregados celulares em suspensão utilizando recipientes ULA, meio de culturas adequados e / ou agitação (33-35). Heredia-Soto e coautores (49) utilizaram este sistema de cultivo para caracterizar moléculas marcadoras da transição epitélio-mesenquimal de 16 linhagens celulares de carcinoma de ovário seroso, entre as quais apenas uma correspondia ao tipo de baixo grau. Uma nova técnica de cultivo celular que combina recipientes ULA e campo magnético tem sido utilizada para promover o desenvolvimento 3D de diferentes tipos de células primárias humanas bem como linhagens celulares, incluindo neoplásicas (50-53). Recentemente Pan e coautores (50) obtiveram sucesso ao utilizar essa técnica para avaliar a influência do microRNA 509-3p na agregação celular de seis diferentes linhagens de carcinoma de ovário seroso de alto grau.

Em todos estes estudos a morfologia dos agregados celulares variou do redondo ao irregular alongado e no nível de compactação celular, do denso ao solto (48,49) indicando que a técnica de cultivo 3D não determina sozinha a morfologia final do agregado celular, o qual depende da capacidade de organização intrínseca das próprias células em crescimento. Semelhantemente, o formato dos agregados celulares da linhagem CAISMOV24, não foi determinado exclusivamente pelo campo magnético, mas pela capacidade de arranjo inerente das células em crescimento. Observou-se que os agregados gerados com a linhagem CAISMOV24 são similares aos agregados encontrados em lavados peritoneais ou ascites de pacientes com câncer de ovário, positivos para a presença de células tumorais (54). A análise dos cortes histológicos dos agregados de CAISMOV24 revelou uma estrutura papilar, indicando ocorrer diferenciação no arranjo celular. De fato, Lee e coautores (48) relataram que o cultivo 3D favorece a diferenciação dos agregados celulares em tecidos, mesmo após longos períodos de cultivo 2D. A análise imunohistoquímica revelou ainda, a expressão de

proteínas, como PAX8 e receptores de progesterona, sugerindo CEO funcionais nos agregados celulares.

O índice de proliferação celular da linhagem CAISMOV24 foi menor no cultivo 3D em comparação com o cultivo 2D. Outros estudos também relataram menor proliferação celular de linhagens de carcinoma de ovário no cultivo 3D (27,48). Isso poderia ser uma consequência da inibição da proliferação celular por contato, que ocorre mais cedo nas culturas 3D do que nas 2D. Entretanto, é preciso avaliar se o campo magnético poderia ter um papel na inibição da proliferação celular. Embora, estudos tenham afirmado que o campo magnético fraco não produz efeitos biológicos (21,55,56), existem dados sugerindo que a exposição ao campo magnético poderia influenciar especificamente populações celulares altamente proliferativas, como as células tumorais (57,58).

É consenso que interações entre células tumorais e linfócitos têm um papel importante na resposta antitumoral e também na capacidade evasiva do tumor (10-12), por isso tem se investido no desenvolvimento de técnicas que promovam o cocultivo 3D entre linfócitos e células tumorais (31,32,59). Nossos resultados mostraram que o cocultivo de células CAISMOV24 com CMSPs conjugadas com NanoShuttleTM sob campo magnético aumentou significativamente a incorporação de linfócitos nos agregados de células CAISMOV24. Além disso, observamos a presença de diferentes subpopulações de linfócitos nos agregados validando esse sistema de cultivo 3D como uma abordagem *in vitro* útil para estudar as interações linfocitárias no microambiente de CEO. Nossos resultados também mostraram que as células citotóxicas (linfócitos NKs e CD8) foram ativadas e apontaram o subtipo T-reg como um linfócito persistente de longo prazo presente nos agregados celulares, em um sentido semelhante ao mostrado em pacientes com CEO (36,43).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo concluímos que o cultivo 3D baseado em magnetismo permitiu a geração de agregados celulares com a linhagem CAISMOV24 com características semelhantes à do tumor de origem. Este método permitiu a recuperação de linfócitos a partir de agregados celulares obtidos pelo cocultivo de CMSPs com a linhagem CAISMOV24. Assim, consideramos que esse sistema de cultivo 3D é adequado para o estudo das interações celulares imunes no microambiente tumoral.

7. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerj I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. PubMed
2. Vargas AN. Natural history of ovarian cancer. *Ecancermedicalscience*. 2014;8(465):1-10. doi:10.3332/ecancer.2014.465. PubMed
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;6(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21387. PubMed
4. Huang H, Li YJ, Lan CY, Huang QD, Feng YL, Huang YW et al. Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma*. 2013;60(5):546-552. doi: 10.4149/neo_2013_071. PubMed
5. Berns EMLL, Bowtell DD. The changing view of high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res*. 2012;72(11):2701-4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3911. PubMed
6. Forstner R, Meissnitzer M, Margarida T. Update on Imaging of Ovarian Cancer. *Curr Radiol Rep*. 2016;4:31. doi: 10.1007/s40134-016-0157-9. PubMed
7. Okoye E, Euscher ED, Malpica A. Ovarian low-grade serous carcinoma: A clinicopathologic study of 33 cases with primary surgery performed at a single institution. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(5):627-35. doi: org/10.1097/PAS.0000000000000615. PubMed
8. Ahn G, Folkins AK, McKenney JK, Longacre TA. Low-grade serous carcinoma of the ovary: Clinicopathologic analysis of 52 invasive cases and identification of a possible noninvasive intermediate lesion. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(9):1165-76. doi: org/10.1097/PAS.0000000000000693. PubMed
9. Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15 Suppl 3:212-20. doi: 10.1111/j.1525-1438.2005.00444.x. PubMed
10. Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):355-66. doi: 10.1038/nrc1611. PubMed
11. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev*. 2008 Apr;222:101-16. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x. PubMed

12. Kim S, Kim B, Song YS. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2016;107(9):1173-8. doi: 10.1111/cas.12987. PubMed
13. Thériault BL, Portelance L, Mes-Masson AM, Nachtigal MW. Establishment of primary cultures from ovarian tumor tissue and ascites fluid. *Methods Mol Biol.* 2013;(1049):323-36. doi: 10.1007/978-1-62703-547-7_24. PubMed
14. Life Technologies Corporation (UK). *Cell culture Basics: Now includes transfection.* Thermo Fisher Scientific; 2014. p. 2.
15. Jacob F, Nixdorf S, Hacker NF, Heinzelmann-Schwarz VA. Reliable *in vitro* studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res.* 2014;7:60. doi: 10.1186/1757-2215-7-60. PubMed
16. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 2012;565(7738):E5-E6. doi: 10.1038/s41586-018-0722-x. PubMed
17. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumor models by comparison of genomic profiles. *Nature commun.* 2013;4:2126. doi: 10.1038/ncomms3126. PubMed
18. Fernández ML, DiMattia GE, Dawson A, Bamford S, Anderson S, Hennessy BT, et al. Differences in MEK inhibitor efficacy in molecularly characterized low-grade serous ovarian cancer cell lines. *Am J Cancer.* 2016;6(10):2235-51.
19. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of *in vitro* morphological subtypes. *PLoS One.* 2014;9(9):e103988. doi: 10.1371/journal.pone.0103988. PubMed
20. da Silva RF, Cardozo DM, Rodrigues GOL, Souza-Araujo CN, Migita NA, Andrade LALA. CAISMOV24, a new human low-grade serous ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer.* 2017;17(1):756-68 doi: 10.1186/s12885-017-3716-4. PubMed
21. Haisler WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc.* 2013;8(10):1940-9. doi: 10.1038/nprot.2013.125. PubMed

22. Gavalas NG, Kardimou A, Dimopoulos MA, Bamias A. Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. Clin Dev Immunol. 2010;2010:791603. doi: 10.1155/2010/791603. PubMed
23. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. Semin Cancer Bio. 2005;15(5):365-77. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.002. PubMed
24. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell. 2007;130(4):601-10. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.006. PubMed
25. Freire D. Os jardins suspensos das células. Em Revista FAPESP. Porque envelhecemos. ed 254. São Paulo: Revista FAPESP; 2017. p.58-61.
26. Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci. 1987;84(1):136-40. doi: 10.1073/pnas.84.1.136. PubMed
27. Lawrenson K, Notaridou M, Lee N, Benjamin E, Jacobs IJ, Jones C, et al. *In vitro* three-dimensional modeling of fallopian tube secretory epithelial cells. BMC Cell Biol. 2013 Sep;14:43. doi: 10.1186/1471-2121-14-43. PubMed
28. White EA, Kenny HA, Lengyel E. Three dimensional modeling of ovarian cancer. Adv Drug Deliv Rev. 2014 Dec;0:184-92. doi: 10.1016/j.addr.2014.07.003. PubMed
29. Loessner D, Holzapfel BM, Clements JA. Engineered microenvironments provide new insights into ovarian and prostate cancer progression and drug responses. Adv Drug Deliv Rev. 2014 Jun;193-213. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.001. PubMed
30. Aihara A, Abe N, Saruhashi K, Kanaki T, Nishino T (2016) Novel 3-D cell culture system for *in vitro* evaluation of anticancer drugs under anchorage-independent conditions. Cancer Sci 107(12):1858-66. <https://doi.org/10.1111/cas.13095>
31. Augustine TN, Dix-Peek T, Duarte R, Candy GP (2015) Establishment of a heterotypic 3D culture system to evaluate the interaction of TREG lymphocytes and NK cells with breast cancer. J Immunol Methods 426:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.07.003>
32. Hirt C, Papadimitropoulos A, Mele V, Muraro MG, Mengus C, Iezzi G, Terracciano L, Martin I, Spagnoli GC (2014) "*In vitro*" 3D models of tumor-immune system interaction. Adv Drug Deliv Rev 79-80:145-54. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.003>

33. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2017;17(1):1-15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004. PubMed
34. Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR Jr, Ruff LE, et al. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2071-80. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63058-1. PubMed
35. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1977;37(10):3639-43.
36. da Silva RF, Yoshida A, Cardozo DM, Jales RM, Paust S, Derchain S. et al. Natural killer cells response to IL-2 stimulation is distinct between ascites with the presence or absence of malignant cells in ovarian cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5) pii:856. doi: 10.3390/ijms18050856. PubMed
37. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(3):203-13. doi: 10.1056/NEJMoa020177. PubMed
38. Charbonneau B, Goode EL, Kalli KR, Knutson KL, Derycke MS. The immune system in the pathogenesis of ovarian cancer. *Crit Rev Immunol*. 2003;33(2):137-64. doi: 10.1615/critrevimmunol.2013006813. PubMed
39. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):192-8. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.09.039. PubMed
40. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004;10(9):942-9. doi: 10.1038/nm1093. PubMed
41. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *J Exp Med*. 2005;202(8):1075-85. doi:10.1084/jem.20051511. PubMed
42. Smyth, MJ, Teng, MW, Swann, J, Kyparissoudis K, Godfrey, DI, Hayakawa, Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol*. 2006;176(3):1582-1587. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1582. PubMed

43. Landskron J, Helland O, Torgersen KM, Aandahl EM, Gjertsen BT, Bjørge L. Activated regulatory and memory T-cells accumulate in malignant ascites from ovarian carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(3):337-47. doi: 10.1007/s00262-014-1636-6. PubMed
44. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(2):169-83. doi: 10.1016/s1359-6101(01)00021-1. PubMed
45. Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(1):35-41. doi: 10.1016/j.tips.2011.09.004. PubMed
46. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 2019;39(1):6-21. doi: 10.1089/jir.2018.0019. PubMed
47. Fuller ES, Howell VM. Culture models to define key mediators of cancer matrix remodeling. *Front Oncol.* 2014;4:57. doi: 10.3389/fonc.2014.00057. eCollection 2014. PubMed
48. Lee JM, Mhawech-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA, Lawrenson K. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells *in vitro*. *Lab Invest.* 2013;93(5):528-42. doi: 10.1038/labinvest.2013.41. PubMed
49. Heredia-Soto V, Redondo A, Berjón A, Miguel-Martín M, Díaz E, Crespo R. High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical model of disease. *Oncotarget.* 2018;9(31):21893-903. doi: 10.18632/oncotarget.25098. PubMed
50. Pan Y, Robertson G, Pedersen L, Lim E, Hernandez-Herrera A, Rowat AC, et al. miR-509-3p is clinically significant and strongly attenuates cellular migration and multi-cellular spheroids in ovarian cancer. *Oncotarget.* 2016;7(18):25930-48. doi: 10.18632/oncotarget.8412. PubMed
51. Du V, Luciani N, Richard S, Mary G, Gay C, Mazuel F, et al. A 3D magnetic tissue stretcher for remote mechanical control of embryonic stem cell differentiation. *Nat Commun.* 2017;8(1):400. doi: /10.1038/s41467-017-00543-2. PubMed

52. Leonard F, Godin B. 3D *in vitro* Model for Breast Cancer Research Using Magnetic Levitation and Bioprinting Method. *Methods Mol Biol.* 2016;1406:239-51. doi: 10.1007/978-1-4939-3444-7_21. PubMed
53. Molina JR, Hayashi Y, Stephens C, Georgescu M. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia.* 2010;12(6):453-63. doi: 10.1593/neo.10126. PubMed
54. Shield P. Peritoneal washing cytology. *Cytopathology* . 2004;15:131-141.
55. Tseng H, Gage JA, Raphael RM, Moore RH, Killian TC, Grande-Allen KJ et al. Assembly of a Three-Dimensional Multitype Bronchiole Coculture Model Using Magnetic Levitation. *Tissue Engineering: Part C.* 2013;19(9):665-675. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0157. PubMed
56. Hore P. Are biochemical reactions affected by weak magnetic fields? *PNAS.* 2012;31,109(5):1357–1358. doi:: 10.1073/pnas.1120531109.
57. Van Huizen AV, Morton JM, Kinsey LJ, Von Kannon DG, Saad MA, Birkholz TR et al. Weak magnetic fields alter stem cell-mediated growth. *Sci. Adv.* 2019; 5:eaau7201 doi: 10.1126/sciadv.aau7201. PubMed
58. . Martino CF, Portelli L, McCabe K, Hernandez M, Barnes F. Reduction of the Earth's magnetic field inhibits growth rates of model cancer cell lines. *Bioelectromagnetics.* 2010;31:649–655. doi: 10.1002/bem.20606. PubMed
59. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Clevers H, Schumacher TN, Voest EE. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell.* 2018;(6)174:1586-98. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.009.

8. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Desenvolvimento de um modelo de cultivo celular tridimensional para estudo do carcinoma seroso de baixo-grau de ovário.

Pesquisadora responsável: **Fernando Guimarães**

Pesquisador (equipe): **Caroline Natânia de Souza Araújo**

Número CAAE: 79825417.4.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntária de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante da pesquisa e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar da pesquisa ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos da pesquisa:

O objetivo desta pesquisa é desenvolver um sistema de cultivo tridimensional *in vitro* para ser utilizado como modelo experimental para estudo do carcinoma seroso de baixo-grau de ovário. Os modelos experimentais baseados no cultivo *in vitro* tridimensional oferecem um sistema acurado para estudo da biologia tumoral.

Descrição dos procedimentos:

Optando por participar do estudo, você estará consentindo com a colheita de uma amostra de 18mL de seu sangue (dois tubos de colheita com 9mL cada tubo). O sangue será colhido por meio de punção da veia do braço e este procedimento será realizado por pessoal capacitado da equipe de enfermagem deste serviço. A amostra de sangue será utilizada para a separação das células brancas, as quais serão mantidas congeladas no laboratório até o momento de seu uso, exclusivamente nos ensaios laboratoriais deste estudo.

Desconfortos e riscos:

Os desconfortos e riscos desta pesquisa estão associados ao procedimento de colheita da amostra de sangue, ou seja, dor no local da punção e possibilidade de equimoses (manchas roxas).

Benefícios:

Não há benefícios diretos a você por participar desta pesquisa. Entretanto, esta pesquisa possibilitará gerar um modelo experimental *in vitro* para estudo do câncer de ovário.

Acompanhamento e assistência:

A colheita da amostra necessária para a pesquisa será realizada durante sua permanência no CAISM. Caso haja alguma intercorrência durante o processo de colheita, você receberá os cuidados médicos necessários.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desta pesquisa, seu nome não será citado.

Ressarcimento e indenização:

Sua participação é voluntária e a colheita da amostra será realizada durante sua permanência no CAISM, assim, não haverá nenhum tipo de ressarcimento. Entretanto, você tem direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, desde que o mesmo se comprove e seja assim definido de forma legal.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com Caroline Natânia de Souza Araújo, ou Fernando Guimarães por meio dos emails: caroline.natania@yahoo.com.br, fernando@caism.unicap.br ou do telefone (19) 3521-9462, no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM, localizado na Rua Alexander Fleming, 101, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-881, Campinas, SP.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você poderá contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de segunda à sexta-feira no período das 8h30 às 11h30 e das 13h às 17h: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887, Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521- 7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecida sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome da participante:

Data: ____/____/____

(Assinatura do participante)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

9. ANEXOS

ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de um modelo de cultivo celular tridimensional para estudo do carcinoma seroso de baixo-grau de ovário.

Pesquisador: CAROLINE NATANIA DE SOUZA ARAÚJO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79825417.4.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.427.262

Apresentação do Projeto:

Adequada. O carcinoma epitelial de ovário é o mais letal entre os cânceres ginecológicos, ocupando o quinto lugar entre as causas de morte de mulheres por câncer. Quando a enfermidade está limitada ao ovário, a cirurgia pode ser curativa, beneficiando 92% das pacientes tratadas. No entanto, a maioria dos casos (61%) são diagnosticados em estágio avançado, para o qual a sobrevida em 5 anos é de apenas 27%. A razão para o diagnóstico tardio do câncer de ovário está em sua natureza assintomática e na ausência de marcadores para triagem precoce da doença. Dor e inchaço abdominal podem ser os primeiros sintomas, os quais estão, frequentemente associados com metástases e a formação de ascite. Noventa por cento dos cânceres de ovário são de origem epitelial. Compreendem quatro tipos histológicos principais que são classificados, adicionalmente, com base no crescimento e características moleculares em tumores de desenvolvimento lento ou de tipo I e tumores mais agressivos ou de tipo II. O tipo histológico seroso, compreende 70% dos cânceres epiteliais de ovário, entre os quais, os de alto-grau ou tipo II, respondem por dois terços de todas as mortes por câncer de ovário. Embora o tumor seroso de baixo-grau, ou tipo I, seja menos frequente que o de alto-grau, mulheres com carcinoma seroso de baixo-grau avançado ou recorrente apresentam taxa de sobrevida semelhante à de mulheres com tumores de alto-grau. O tratamento de tumores em grau avançado baseia-se na cirurgia e quimioterapia com agentes derivados de platina (carboplatina e cisplatina) em combinação com taxanos (paclitaxel e docetaxel). Contudo, a maioria das pacientes (60-70%) que recidivam entre 2 e 5 anos após a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

primeira linha de tratamento, evoluem para óbito. A natureza difusa do câncer de ovário e a rápida disseminação metastática limitam a eficácia da terapia, bem como, respondem pela característica dos carcinomas avançados de ovário desenvolverem ascite peritoneal. Linhagens celulares derivadas de diferentes tipos de neoplasias são amplamente empregadas no estudo do câncer, incluindo o câncer de ovário. Usualmente, o cultivo in vitro das linhagens celulares é mais simples e padronizado que o de células primárias e agrega vantagens como a possibilidade de serem armazenadas e compartilhadas entre diferentes laboratórios de pesquisa, ampliando seu uso como modelos experimentais. Entretanto, as linhagens celulares são suscetíveis à seleção clonal, alterações genéticas e/ou metabólicas decorrentes dos longos períodos de manutenção in vitro e que podem alterar características relevantes que distanciam as linhagens celulares de suas células cognatas. Preferencialmente, quanto mais semelhanças houver entre a linhagem celular e as células neoplásicas primárias, maior será a utilidade da linhagem como modelo experimental. Atualmente, a “Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia” (CCLE <https://www.broadinstitute.org/ccle/data/browseSamples>) inclui 52 linhagens celulares de câncer de ovário humano. Autores publicaram uma revisão incluindo 104 linhagens celulares humanas derivadas de neoplasias de ovário ou de células da superfície epitelial do ovário. Entretanto, há um número limitado de linhagens celulares que bem caracterizadas como modelos in vitro. Além disso, algumas das linhagens celulares mais utilizadas como modelos experimentais não correspondem aos respectivos tipos histológicos, conforme demonstrado por outros autores que compararam o perfil genômico de 47 linhagens celulares ovarianas com amostras de tumores de ovário. Assim, novas linhas de células bem caracterizadas, bem como o desenvolvimento de sistemas de cultivo celular que preservem a natureza histológica e molecular dos diferentes subtipos de neoplasias ovarianas são necessários como modelos experimentais para o estudo acurado desta doença. Particularmente, o histotipo seroso de baixo-grau do carcinoma epitelial de ovário é conhecido por ser de difícil cultivo in vitro e apresentar poucas linhagens celulares estabelecidas (MPSC-1, HOC-7) disponíveis para estudo. Cultivo celular tridimensional A maioria dos estudos do carcinoma epitelial de ovário humano utilizando modelos in vitro baseia-se em sistemas de cultivo bidimensional. Nestes sistemas, as células de origem epitelial crescem aderidas à superfície plástica do frasco de cultivo, formando uma monocamada celular. Embora este sistema de cultivo tenha possibilitado a aquisição de conhecimentos sobre a biologia tumoral sua utilidade é limitada, pois não reproduz a complexidade do microambiente tumoral, o que resulta em alterações morfológicas e funcionais das células. Por outro lado, no sistema tridimensional de cultivo celular busca-se recriar características fundamentais dos tecidos, reproduzindo a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

arquitetura e preservando a função das células que o constituem. Este sistema de cultivo deve possibilitar a interação entre vários tipos de células, produção de matriz extracelular para sustentação e regulação da função celular e síntese de fluidos intersticiais. Assim, modelos experimentais in vitro baseados neste sistema oferecem maior acurácia fisiológica, situando-os entre os modelos bidimensionais in vitro e os modelos in vivo. Um exemplo clássico que mostra as vantagens do sistema tridimensional sobre o bidimensional provém de estudos na década de 80. Naquela ocasião, observou-se que células epiteliais mamárias de camundongo cultivadas sobre matriz extracelular, recriavam o arranjo morfológico encontrado in vivo e preservavam a função produtora de proteínas lácteas. Em comparação, na ausência da matriz extracelular as células cresciam como monocamada e não eram capazes de produzir leite, mesmo quando estimuladas por hormônios lactogênicos. Tais diferenças funcionais entre os dois sistemas de cultivo celular refletem alterações da expressão gênica. Neste sentido, outros autores mostraram que a expressão gênica de células epiteliais das trompas de falópio cultivadas no sistema tridimensional assemelhou-se a das células in vivo, enquanto o cultivo bidimensional promoveu alterações da expressão. Frequentemente, os modelos de cultivo tridimensional de neoplasias, incluindo o carcinoma epitelial de ovário, são obtidos pelo cultivo de fragmentos de tecido, suspensão de células primárias ou de linhagens celulares sobre uma matriz polimérica natural ou sintética. Tais modelos vêm sendo empregados para estudos sobre a interação entre as células neoplásicas com a matriz extracelular, mecanismos de invasão maligna, suscetibilidade e resistência das células neoplásicas a drogas e, mais recentemente, estudos sobre a interação do sistema imunológico com o microambiente tumoral. Outro recurso utilizado para gerar estruturas neoplásicas tridimensionais in vitro, baseia-se no emprego de recipientes que impedem a adesão das células, os quais combinados ao uso de meios de cultivo adequados e/ou agitação, promovem o crescimento de células epiteliais como agregados celulares livres ou esferócitos. Uma nova tecnologia para a geração e cultivo in vitro de esferócitos passou a ser disponibilizada comercialmente pela n3D Biosciences, Inc (Houston, TX, USA). Esta tecnologia baseia-se no emprego de campo magnético para promover a levitação de células conjugadas a nanopartículas que contém ferro. Este sistema foi empregado com sucesso para gerar esferócitos de diversos tipos celulares, incluindo células-tronco, células primárias e linhagens neoplásicas humanas e de outras espécies. Todavia, este sistema ainda não foi avaliado com células neoplásicas do carcinoma epitelial de ovário. A geração de esferócitos em cultura celular é particularmente interessante como modelo in vitro para estudo do carcinoma epitelial seroso de ovário, visto que os esferócitos são semelhantes aos agregados celulares encontrados nas ascites carcinomatosas e

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

estão intimamente associados com a disseminação metastática nesta neoplasia. Linhagem de carcinoma epitelial seroso de baixo-grau do ovário, CAISMOV24. A linhagem CAISMOV24 é uma nova linhagem de carcinoma epitelial de ovário humano, a qual foi estabelecida por nosso grupo de pesquisa no Hospital da Mulher da Unicamp – CAISM. Esta linhagem celular foi descrita no relatório científico do auxílio à pesquisa 2014/17444-1 e no manuscrito "CAISMOV24, a new human low-grade serous ovarian carcinoma cell line", submetido para publicação no periódico BMC Cancer. A linhagem celular CAISMOV24 foi estabelecida pelo cultivo e imortalização espontânea de células neoplásicas obtidas a partir da ascite carcinomatosa associada a um carcinoma seroso de baixo-grau do ovário de uma mulher com 60 anos de idade. Esta linhagem celular vem sendo mantida por mais de 115 passagens in vitro. O emprego da técnica de hibridização genômica comparativa, mostrou que o padrão de alterações genômicas da linhagem CAISMOV24 mantém-se semelhante ao das células neoplásicas primárias que a originou, indicando o potencial das células CAISMOV24 como modelo experimental in vitro para o estudo do carcinoma seroso de baixo-grau de ovário. Interação entre linfócitos e o carcinoma epitelial de ovário É consenso que as diferentes populações de linfócitos encontradas infiltrando ou associadas aos tumores, bem como suas citocinas, podem ter significado clínico e valor prognóstico inclusive para o câncer de ovário. Especificamente, observou-se que pacientes com câncer de ovário, tratadas por cirurgia e quimioterapia, cujos tumores continham infiltrado de linfócitos T CD3+, tiveram taxa de sobrevida superior à daquelas sem o mesmo infiltrado linfocitário. Além disso, observou-se que presença de infiltrado linfocitário do subtipo CD8+ correlacionava-se ainda mais fortemente com o prolongamento da sobrevida das pacientes tratadas que a correlação obtida com os linfócitos CD3+. Em contraste, a infiltração por linfócitos T reguladores (T-reg) foi associada à menor sobrevida e ao comprometimento da função imunológica. A presença de linfócitos T-reg, bem como de linfócitos T de memória e natural killer (NK) também tem sido documentada nas ascites carcinomatosas associadas ao câncer de ovário. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que o desempenho funcional das células NK presentes nas ascites associadas aos carcinomas epiteliais de ovário é significativamente superior nas ascites livres de células neoplásicas em comparação com as ascites carcinomatosas. Observou-se que as células NK das ascites carcinomatosas não respondem ao estímulo com IL-2 que deveria aumentar sua degranulação. Em contraste, as células NK das ascites sem células neoplásicas são responsivas a IL-2 e sua degranulação superou, inclusive, as células NK do sangue de mulheres saudáveis. Assim, o perfil de linfócitos infiltrando ou associados aos carcinomas epiteliais de ovário reúne elementos que indicam a ação do sistema imunológico contra o tumor,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

combinada a geração de um microambiente supressor e que, atualmente, é mal compreendido.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo desta pesquisa é desenvolver um sistema de cultivo tridimensional in vitro para ser utilizado como modelo experimental para estudo do carcinoma seroso de baixo-grau de ovário.

Objetivo Secundário:

Avaliar o sistema n3D Biosciences Inc. para gerar esferócitos com a linhagem celular CAISMOV24, caracterizando os esferócitos quanto à sua histologia (organização celular e formação de matriz extracelular). Comparar os sistemas de cultivos tridimensional e bidimensional quanto à sua influência sobre a proliferação das células da linhagem CAISMOV24. Comparar os sistemas de cultivos tridimensional e bidimensional quanto à sua influência sobre a expressão e intensidade de expressão das moléculas de superfície celular CD44, CD24, CD326, CD155, CD39, CD73, TGF1 pelas células da linhagem CAISMOV24. Utilizar o sistema n3D Biosciences Inc. para cocultivo da linhagem CAISMOV24 e células mononucleadas do sangue periférico (CMSP), caracterizando a incorporação de linfócitos nos esferócitos de células neoplásicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os desconfortos e riscos desta pesquisa estão associados ao procedimento de coleta da amostra de sangue, ou seja, dor no local da punção e possibilidade de equimoses (manchas roxas). Há risco associado a confidencialidade da identidade do participante de pesquisa. Os pesquisadores se comprometem com a preservação da identidade dos participantes. O sigilo e respeito à confidencialidade, bem como, a possibilidade de rastreamento dos dados e da origem das amostras serão garantidos por um sistema de codificação. O sistema de codificação das amostras será definido pelo responsável pela guarda do material biológico juntamente com o pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa que gerou a necessidade de armazenamento da amostra.

Benefícios:

Não há benefícios diretos aos participantes de pesquisa. Entretanto, esta pesquisa possibilitará gerar um modelo experimental in vitro para estudo do câncer de ovário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo está bem escrito, detalhado e claro. A metodologia é adequada e factível. Serão incluídas neste estudo cinco participantes, convidados entre os membros do grupo de pesquisa a ceder uma amostra de 18ml de sangue periférico colhido por punção da veia do braço. Serão

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

incluídos no estudo apenas aqueles que aceitarem participar voluntariamente após receberem esclarecimento quanto aos objetivos da pesquisa e procedimentos a que serão submetidos. A anuência do participante dar-se-á pela assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Os procedimentos adotados neste projeto serão homologados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e respeitarão os princípios enunciados na Declaração de Helsinque e na resolução CNS 466/2012 do Ministério da Saúde. A coleta de sangue periférico será realizada pelo Serviço de Enfermagem do CAISM por meio de punção venosa utilizando sistema de coleta a vácuo. As coletas serão realizadas durante o período de permanência dos participantes de pesquisa na instituição, evitando que os participantes venham a instituição exclusivamente para o procedimento. Serão coletados 18 ml de sangue, acondicionados em 2 tubos contendo heparina, cada um, com capacidade para 9ml. (Vacuette®, Greiner Bio-one, Campinas, Brasil). As CMSP serão isoladas por gradiente de centrifugação (Ficoll- Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) e criopreservadas com SFB (soro fetal bovino, Nutricell-Nutrientes Celulares®, Campinas, Brasil) contendo 10% de dimetilsulfóxido em nitrogênio líquido, até o momento de uso. As CMSP dos participantes de pesquisa serão utilizadas nos procedimentos de cocultivo in vitro com células da linhagem CAISMOV24. Os procedimentos e ensaios incluem: O cultivo bidimensional da linhagem CAISMOV24, bem como o cultivo tridimensional da linhagem CAISMOV24, a colheita das amostras de sangue para isolamento das CMSP e o cocultivo tridimensional dessas células com CAISMOV24. Os esféricitos gerados serão processados e avaliados quanto as características histológicas e imunohistoquímicas. Os marcadores de superfície celular das células CAISMOV24 também serão analisados. Serão caracterizados os subtipos de linfócitos infiltrados nos esféricitos. Também será avaliada a proliferação das células CAISMOV24.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa, foi encaminhada a folha de rosto da CONEP assinada pelo pesquisador e complementada por autorização do Diretor Executivo/Superintendente do CAISM/Unicamp. No TCLE a linguagem é clara. Constan o título completo da pesquisa e o nome dos pesquisadores responsáveis. Nele constam a justificativa, a descrição dos procedimentos envolvidos, e há menção sobre riscos e benefícios. Está explicado como será feito o acompanhamento, e que poderá haver esclarecimentos se necessário. Está claro o direito de recusa, e que a recusa não acarretará em consequências para o participante da pesquisa. Está claro que haverá confidencialidade dos dados. Está claro que o TCLE será elaborado em duas vias, e que o participante irá receber uma delas. Há dados do CEP e formas de contato com o pesquisador. Há campo para a rubrica do participante e do pesquisador nas páginas do TCLE. Constan no TCLE

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

dados sobre possíveis ressarcimentos, e garante indenização por danos decorrentes da pesquisa. Consta o Termo de Responsabilidade do Pesquisador, no qual o mesmo assegura ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foi encaminhado, também, o Regulamento do Biorrepositório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1018472.pdf	09/11/2017 16:19:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/11/2017 16:18:47	CAROLINE NATANIA DE SOUZA ARAÚJO	Aceito
Outros	Parecerconsubstanciado.pdf	09/11/2017 15:32:42	CAROLINE NATANIA DE	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/11/2017 15:31:08	CAROLINE NATANIA DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2017_11_08projCultivo3D.pdf	09/11/2017 15:23:40	CAROLINE NATANIA DE SOUZA ARAÚJO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Normasarmazenamento.pdf	23/10/2017 15:39:02	CAROLINE NATANIA DE SOUZA ARAÚJO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.427.262

CAMPINAS, 11 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

ANEXO II- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

02/08/2019

E-mail de Unicamp - [Cells] Manuscript ID: cells-576706 - Submission Received



Fernando Guimaraes <thergui@unicamp.br>

[Cells] Manuscript ID: cells-576706 - Submission Received

1 mensagem

Editorial Office <cells@mdpi.com>

2 de agosto de 2019 13:29

Responder a: cells@mdpi.com

Para: Fernando Guimarães <fernando@caism.unicamp.br>

Cc: Caroline Natânia de Souza-Araújo <caroline.natania@yahoo.com.br>, Cláudia Rodrigues Tonetti <claudinha.tonetti@gmail.com>, Marcella Regina Cardoso <macardoso86@hotmail.com>, Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade <lucci@unicamp.br>, Rodrigo Fernandes da Silva <rodrigoiverson@hotmail.com>, Luís Gustavo Romani Fernandes <lgrf@fcm.unicamp.br>, Fernando Guimarães <fernando@caism.unicamp.br>

Dear Dr. Guimarães,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Cells

Manuscript ID: cells-576706

Type of manuscript: Article

Title: Three-dimensional cell culture model to study low-grade serous ovarian carcinoma.

Authors: Caroline Natânia de Souza-Araújo, Cláudia Rodrigues Tonetti, Marcella Regina Cardoso, Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade, Rodrigo Fernandes da Silva, Luís Gustavo Romani Fernandes, Fernando Guimarães *

Received: 2 August 2019

E-mails: caroline.natania@yahoo.com.br, claudinha.tonetti@gmail.com, macardoso86@hotmail.com, lucci@unicamp.br, rodrigoiverson@hotmail.com, lgrf@fcm.unicamp.br, fernando@caism.unicamp.br

Advancing Human Cell Culture by Adding New Dimensions (3D), Fluid Flow or Using Primary Cultures

https://www.mdpi.com/journal/cells/special_issues/human_cell_culture

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/264e0017aea44f961ed838a284afe451

The following points were confirmed during submission:

1. Cells is an open access journal with publishing fees of 1800 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/cells/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Cells editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission. (Please refer to the Rights & Permissions website: <https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=443797f861&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1640773313441940455&simpl=msg-f%3A1640773...> 1/2